



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE FIBRAS  
HILADAS DE (PLA) Y LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN  
RATAS *WISTAR*, PARA SU POSIBLE USO EN  
REGENERACIÓN DE TEJIDOS.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N O   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

SANTIAGO ARTURO CAMELA MARTÍNEZ

TUTORA: Dra. JANETH SERRANO BELLO

ASESORES: Dr. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ  
Dra. PATRICIA GONZÁLEZ ALVA

MÉXICO, CDMX

2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos**

Gracias a mis padres, Alejandra Margarita Martínez Buendía y Arturo Camela Barrera, por haberme enseñado con su ejemplo el valor del trabajo con dedicación y disciplina, por el gran esfuerzo que realizan día con día y por su apoyo incondicional. A mi hermana Dalia Cristina Camela Martínez por su cariño y afecto.

Le agradezco a la Dra. Janeth Serrano Bello por su guía durante este proyecto, por su paciencia al enseñarme, por su apoyo académico y personal, por su dedicación a la investigación y a la docencia, que la hacen un ejemplo a seguir.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez, por su confianza, por la ayuda y el asesoramiento que me brindó en este proyecto y por los muchos consejos durante mi estancia en el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos (DEPel) FO UNAM.

A la Dra. Patricia González Alva por su asesoramiento y orientación a lo largo de este trabajo.

A los profesores que me dieron las herramientas y la inspiración para continuar aprendiendo cada día.

Les agradezco por la ayuda, las facilidades y el apoyo a este proyecto al Departamento de Patología y Medicina Bucal (DEPel) de la FO UNAM.

Al Laboratorio de Biomateriales Dentales (DEPel) de la FO UNAM, en especial al Dr. Carlos A. Alvarez Gayosso, por su apoyo e instrucción.

Al Instituto de Física UNAM, principalmente al Dr. Luis Alberto Medina Velázquez y al M. en C. Manuel Aguilar Franco.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales UNAM, especialmente a la Dra. Sandra Rodil por las facilidades prestadas para la adquisición de imágenes histológicas.

A la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina UNAM, en particular al Dr. Enrique Pinzón Estrada, jefe de la misma, al M.V.Z. Ismael Torres Saldaña y al M.V.Z. Víctor Manuel Salgado Alfaro y a la Unidad de Bioterio (DEPeI) FO UNAM, en especial al Sr. Juan Manuel Trejo Ramírez por su apoyo técnico en el cuidado y manejo de los animales de laboratorio.

Gracias a todos los integrantes del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos (DEPeI) FO UNAM por sus consejos y ayuda durante mi estancia, en especial a Vladimir G., José Luis S., Osmar C. y Febe.

Se agradece el apoyo al proyecto DGAPA-UNAM-PAPIIT IN210815 para la realización de este trabajo.

A la Facultad de Odontología y a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme una gran profesión, enseñanzas valiosas, amigos incondicionales, muchas satisfacciones y alegrías que han de acompañarme por mucho tiempo.



# Índice

Índice de abreviaturas	vii
Resumen	ix
Abstract	x
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1. Defectos óseos maxilares	2
2.2. Tratamiento en defectos óseos	3
2.2.1. Clasificación de injertos	5
2.3. Ingeniería de tejidos	6
2.4. Regeneración ósea	7
2.5. Regeneración ósea guiada (ROG) y regeneración tisular guiada (RTG)	9
2.6. Andamios	10
2.7. Tipos de andamios	12
2.8. Andamios de poli (ácido-láctico) (PLA)	12
2.9. Técnica de hilado por propulsión de aire (AJS)	14
3. Planteamiento del problema y justificación	15
4. Hipótesis	16
5. Objetivos	17
5.1. Objetivos generales	17
5.2. Objetivos específicos	17
6. Metodología	18
6.1. Diseño y elaboración de andamios de poli (ácido-láctico) (PLA)	18
6.1.1. Depósito de las microfibras	18
6.1.2. Diseño de las muestras	19

6.2. Esterilización de los andamios-----	20
6.3. Pruebas de degradación <i>in vitro</i> de las fibras de PLA -----	20
6.4. Soluciones control y experimental.-----	20
6.5. Evaluación del peso de los andamios -----	21
6.6. Evaluación del pH de las soluciones -----	21
6.7. Pruebas mecánicas-----	21
6.8. Evaluación de la estructura superficial -----	23
6.9. Pruebas <i>in vivo</i> (respuesta inflamatoria en ratas de la cepa Wistar)-----	23
6.10. Sacrificio de los modelos animales-----	24
6.11. Análisis estadístico-----	25
7. Resultados -----	26
7.1. Resultados <i>in vitro</i> -----	26
7.1.1. Resultados de la evaluación del peso -----	26
7.1.2. Resultados de la evaluación del pH -----	27
7.1.3. Pruebas mecánicas-----	29
7.1.4. Estructura superficial -----	31
7.2. Resultados <i>in vivo</i> -----	35
7.2.1. Respuesta histológica a los 8 días-----	35
7.2.2. Respuesta histológica a los 20 días -----	36
7.2.3. Respuesta histológica a los 40 días -----	37
7.2.4. Respuesta histológica a los 60 días -----	38
7.2.5. Respuesta histológica a los 80 días -----	39
7.2.6. Respuesta histológica a los 100 días -----	40
8. Discusión -----	41
9. Conclusiones -----	46
10. Referencias bibliográficas -----	48
11. Anexos-----	52
(A) Tablas de registro de pruebas <i>in vitro</i> -----	52
(B) Tabla de resultados (evaluación de peso <i>in vitro</i> ) -----	54

(C) Tabla de resultados (evaluación de pH <i>in vitro</i> )-----	54
(D) Tabla de registro de pruebas mecánicas -----	55
(E) Tabla de resultados (pruebas mecánicas) -----	56
(F) Tabla de resultados (estructura superficial)-----	57

## Índice de abreviaturas

**AJS:** Hilado por propulsión de aire (del inglés Air Jet Spinning)

**ANOVA:** Análisis de varianza

**cm:** Centímetro

**col:** Colaboradores

**DEPeI:** División de Estudios de Posgrado e Investigación

$\sigma$ : Desviación estándar

$\emptyset$ : Diámetro

**ECM:** Matriz extracelular (del inglés extracellular matrix)

**FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés Food and Drug Administration)

**FO:** Facultad de Odontología

**g:** Gramos

**h:** Horas

**HE:** Hematoxilina-eosina

**kg:** Kilogramo

**kV:** Kilovoltio

**MEB:** Microscopía electrónica de barrido

**mg:** Miligramo

**mJ:** Milijoule

$\mu\text{J}$ : Microjoule

**MPa:** Megapascal

$\mu\text{m}$ : Micrómetro

**mL:** Mililitro

**mm:** Milímetro



**mm<sup>2</sup>**: Milímetro cuadrado

**mm<sup>3</sup>**: Milímetro cúbico

**nm**: Nanómetro

**PBS**: Medio amortiguado con fosfatos (del inglés phosphate buffered saline)

**PLA**: Poli ácido-láctico

**PLGA**: Poli ácido láctico-co-glicólico

**PCL**: Policaprolactona

**pH**: Potencial de hidrógeno

**psi**: Libras por pulgada cuadrada (del inglés pounds-force per square inch)

$\bar{X}$ : Promedio

**ROG**: Regeneración ósea guiada

**RTG**: Regeneración tisular guiada

**SEM**: Error estándar de la media (del inglés standard error of the mean)

**UNAM**: Universidad Nacional Autónoma de México

## Resumen

Al verse afectado un tejido celular, por trauma, infección, quistes, tumores o enfermedades congénitas, el organismo trata de repararse a sí mismo, sin embargo, no siempre lo logra de manera adecuada, por lo que es indispensable usar biomateriales en el sitio de la lesión, que favorezcan la regeneración del tejido en cuestión.

El presente proyecto describe la fabricación de andamios de poli (ácido-láctico) (PLA) a diferentes concentraciones de polímero (7% y 10%), así como la evaluación de la degradación *in vitro*, a diferentes tiempos (0, 20, 40, 60, 80 y 100 días), tomando en cuenta el peso, cambio de pH, diámetro de las fibras y pruebas mecánicas (módulo elástico y resiliencia). De manera *in vivo*, se implantaron los andamios (7%, 10% y Gelfoam como control) en tejido subcutáneo de ratas de la cepa *Wistar*, con el propósito de evaluar la respuesta histológica alrededor de las muestras así como su degradación.

Los resultados mostraron que los andamios de PLA son un biomaterial con características físico-químicas adecuadas para ser usados en regeneración tisular, principalmente regeneración ósea, mostraron que modifican el pH a la neutralidad, las muestras tienen un módulo elástico y una resistencia propicia para ser usados en regeneración ósea. Las pruebas *in vivo* mostraron al finalizar el estudio que la respuesta inflamatoria fue mínima.

Las pruebas *in vitro* e *in vivo* permitieron entender el comportamiento del biomaterial, en este caso las propiedades físico-químicas y mecánicas de andamios de PLA. Finalmente se observó que los andamios de PLA independientemente de su concentración son biocompatibles.

## Abstract

When a cellular tissue is affected, whether due to trauma, infection, cysts, tumors or congenital diseases, the organism tries to repair itself, however it does not always achieve it in an appropriate way for which it is indispensable to use biomaterials in the site of the injury that favors the regeneration of the tissue in question.

The present project describes the manufacture of polylactic acid (PLA) scaffolds at different concentrations of polymer (7 and 10%), as well as *in vitro* degradation rate evaluation, at different times (0, 20, 40, 60, 80 And 100 days), taking into account weight, pH change, fiber diameter and biomechanical tests (elastic modulus and resilience). In the *In vivo* tests, scaffolds (7%, 10%, and Gelfoam as a control) were implanted into subcutaneous tissue of *Wistar* strain rats, and to evaluate the histological response around the samples as well as their degradation.

The results showed that PLA scaffolds are a biomaterial with favorable physicochemical characteristics to be used in tissue regeneration, mainly bone regeneration, shows too that they modify the pH to the neutrality, the samples have an elastic modulus and a propitious resistance, to be used in bone regeneration. *In vivo* tests showed at the end of the study that the inflammatory response was minimal.

*In vitro* and *in vivo* tests allowed us to understand the behavior of the biomaterial, in this case, the evaluation of the physical-chemical and mechanical properties of PLA scaffolds. Finally, it was observed that PLA scaffolds, regardless of their concentration, are biocompatible.

# 1. Introducción

Actualmente algunas enfermedades como las metabólicas, neoplasias, o procesos inflamatorios crónicos alteran la salud en general de los pacientes, dependiendo de la enfermedad, los tejidos se ven dañados e inclusive se pierden, por lo cual día a día se buscan nuevas alternativas de tratamientos para recuperar estos tejidos, ya que las terapias que se han realizado en las últimas décadas en la clínica resultan deficientes o impredecibles; por tal motivo, las investigaciones están encaminadas en el desarrollo de nuevas tecnologías para que se puedan regenerar los tejidos dañados o perdidos.

Una de las soluciones tecnológicas que ha tomado relevancia en el campo de la medicina regenerativa es la fabricación de andamios poliméricos para su uso como análogos de la matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés) de los tejidos del cuerpo humano con la finalidad de favorecer la regeneración de tejidos (1–3).

En el presente trabajo de investigación se evaluó la degradación que presentan andamios de poli (ácido-láctico) (PLA) a diferentes concentraciones (7% y 10%), para ello se describe la fabricación de dichos andamios por medio de la técnica de hilado por propulsión de aire (AJS por sus siglas en inglés).

Se describen los parámetros que se establecieron para evaluar la degradación *in vitro*, los cuales fueron, el tiempo en todas las condiciones, la modificación del peso, cambios en el pH de las soluciones empleadas, evaluación de la estructura superficial y su comportamiento biomecánico.

Por otro lado se determinó, la respuesta histológica que producía el andamio en tejido celular subcutáneo de modelos animales (ratas de la cepa *Wistar*), con respecto al tiempo establecido.

Los resultados obtenidos del presente trabajo hacen aportaciones importantes para futuras investigaciones en el laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la

División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) de la Facultad de Odontología (FO) – Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), para realizar estudios traslacionales en ratas y así poder evaluar su efecto en la regeneración de tejidos.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Defectos óseos maxilares**

La falla en la función de un órgano y/o tejido como resultado de una herida o por una enfermedad, tiene un alto impacto en la calidad de vida de los pacientes, además de involucrar un alto costo económico y social (4).

En el área odontológica, la enfermedad periodontal que es, junto con la caries, uno de los padecimientos bucodentales con mayor prevalencia a nivel mundial, existe la presencia de defectos óseos, los cuales pueden ser desde fenestraciones y dehiscencias que miden milímetros, hasta la pérdida completa de soporte óseo y la consecuente pérdida de los dientes (5,6).

Además de la enfermedad periodontal, existen otro tipo de lesiones que pueden producir defectos óseos, tales como traumas, quistes, tumores, pérdida dental, la cual provoca disminución del tejido óseo, defectos óseos congénitos, entre otras lesiones. Estos defectos son tratados, con diferentes tipos de materiales como; hueso liofilizado, membranas, andamios o bien prótesis metálicas (6).

## 2.2. Tratamiento en defectos óseos

Los primeros tratamientos para rellenar defectos óseos se realizaron en el área de periodontología, con los trabajos de Prichard (1957), donde observó que los defectos periodontales, si se dejan vacíos después del desbridamiento, se rellenarán con las primeras células que lleguen a la zona, es decir, células epiteliales y fibroblastos, lo que genera un núcleo de tejido fibroepitelial, el cual se adhiere a la superficie radicular. Desafortunadamente, esta unión no da tiempo para que se rellene la bolsa con células óseas y del ligamento periodontal, por lo que el defecto persiste. Este proceso, se conoce como "reparación periodontal", en última instancia, impide la ordenada y secuencial regeneración de verdaderos tejidos periodontales (7).

La posibilidad de obtener una nueva inserción periodontal fue ampliamente aceptada con el trabajo de Prichard, en el que se informó de la formación de nueva inserción en las lesiones periodontales intraóseas como resultado predecible del tratamiento. En 17 casos clínicos lo que realizó Prichard fue colocar membranas de porosidades variables alrededor del defecto periodontal, para prevenir la proliferación de tejido epitelial en el espacio de la lesión y así permitir la regeneración de verdaderos tejidos periodontales, lo anterior lo corroboró con 4 de los casos que se sometieron a una segunda etapa quirúrgica, revelando que los defectos se habían rellenado con hueso. La técnica de Prichard se empleaba solo para el tratamiento de los defectos intraóseos de tres paredes y los resultados obtenidos sugirieron que la morfología del defecto óseo periodontal era esencial para el establecimiento de un pronóstico predecible. Sin embargo sus resultados no eran fácilmente reproducibles en la clínica, aunque su técnica dio pie a otras más recientes mejor soportadas por la evidencia científica (7, 8).

Hablando de defectos óseos periodontales, el tratamiento ideal de esta patología es la nueva inserción con regeneración ósea, siempre que provee obliteración de la bolsa y reconstitución del periodonto marginal, sin embargo las técnicas

disponibles no son del todo confiables y se pueden observar los siguientes resultados:

1. Cicatrización con epitelio de unión largo, que se puede presentar incluso cuando hay relleno de hueso.
2. Anquilosis de hueso y diente con la resorción radicular resultante.
3. Recesión gingival.
4. Recurrencia de la bolsa.
5. Cualquier combinación de las anteriores (7).

Patur y Glickmann (1962) llevaron a cabo un estudio clínico en pacientes que incluía 24 defectos intraóseos tratados siguiendo la técnica de Prichard. En donde se compararon las radiografías preoperatorias con las posoperatorias, evaluando el nivel del hueso alveolar adyacente a la raíz. Los autores observaron que se produjo nueva inserción en los defectos intraóseos de dos y tres paredes, pero no en los de una pared (8).

Sin embargo, la presencia de complicaciones existe, como: hemorragia, hinchazón, infección, necrosis del tejido y dolor agudo, de igual manera es posible el secuestro y resorción de la superficie radicular adyacente al sitio del injerto (9).

En numerosos ensayos clínicos y experimentos con animales se combinó el tratamiento de colgajo con injertos óseos o implante de materiales en los defectos óseos, con el propósito de estimular la regeneración periodontal (8).

### 2.2.1. Clasificación de injertos

De acuerdo con los resultados obtenidos de múltiples investigaciones, se realizó la clasificación actual de injertos de acuerdo con su origen y estructura, con el propósito de establecer algunas de sus características más importantes, que permitan al cirujano realizar la elección adecuada basada en las necesidades estructurales y funcionales requeridas. Según estos criterios, los injertos han sido clasificados en:

- Autólogos: este tipo de injerto se compone por tejido tomado del mismo individuo, y proporciona mejores resultados, ya que es el único que cumple con los 3 mecanismos de regeneración ósea (osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción), además evita la transmisión de enfermedades y el rechazo inmunológico, sin embargo la gran desventaja es la limitada disponibilidad, doble sitio quirúrgico, por consiguiente, mayor inflamación, dolor, entre otras.
- Homólogos (aloinjertos): se componen de tejido tomado de un individuo de la misma especie, no relacionado genéticamente con el receptor; cuenta con capacidad osteoinductiva y osteoconductora, y según Betts (2005) *"se comporta como una estructura que permitirá la neoformación ósea a partir del reemplazo gradual que sufre el injerto por el hueso del hospedero, haciendo este proceso lento y con considerable pérdida de volumen"*. Existen 3 tipos de aloinjertos óseos: congelados, desecados (liofilizados) y desmineralizados.
  - Isogénicos (isoinjertos): se componen por tejido tomado de un individuo genéticamente relacionado con el individuo receptor.
  - Heterólogos (xenoinjertos): se componen de tejido tomado de un donador de otra especie, además clínicamente no son aceptables debido a su gran antigenicidad (10).



Otra clasificación es la siguiente:

I.- Autoinjertos

A.- Cortical (coágulo óseo)

B.- Combinación cortical y esponjoso (mezcla ósea)

C.- Hueso esponjoso y medular

1.- Sitio donador intraoral

2.- Sitio donador extraoral

II.- Aoinjertos

A.- Hueso esponjoso y medular congelado

B.- Hueso desmineralizado liofilizado

II.- Compuesto de autoinjerto y aoinjerto (11).

### **2.3. Ingeniería de tejidos**

Al restituirse un tejido lesionado, su morfología y/o su función difieren del tejido original, denominándolo reparación, en contraste con la regeneración la cual conlleva a la restauración completa de la morfología y la función (8), siendo el objetivo de múltiples investigaciones en la ingeniería de tejidos.

El término tissue engineering (ingeniería tisular) fue adjudicado a esta disciplina en la primavera de 1987 durante una reunión de la Fundación Nacional de Ciencias, pero muchas de las técnicas utilizadas en ella habían sido desarrolladas en décadas anteriores (12).

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que intenta utilizar una variedad de materiales y métodos, para lograr la regeneración de tejidos u órganos perdidos o dañados (13).

Los campos de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa tienen como objetivo promover la regeneración de tejidos o reemplazar órganos lesionados, mediante la combinación de un andamio, células y moléculas bioactivas. Se han propuesto diferentes materiales para ser utilizados, tanto andamios porosos tridimensionales como matrices de hidrogeles para diferentes estrategias de ingeniería tisular. Entre ellos, los polímeros de origen natural son una de las opciones más atractivas, principalmente debido a sus similitudes con la matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés), la versatilidad química, así como un buen rendimiento biológico (14).

Los andamios usados en la ingeniería de tejidos deben ser análogos a la matriz extracelular nativa en términos tanto de composición química como de estructura física. En investigaciones recientes se ha demostrado que los andamios poliméricos sintéticos son similares a la ECM, por lo tanto son buenos candidatos a imitar la ECM (15), además de ser materiales biodegradables, sirviendo como andamios temporales de las células para que puedan adherirse, proliferar y diferenciarse con lo cual se pretende inducir el crecimiento del tejido circundante. En cualquier caso, el papel del biomaterial es temporal, pero crucial para el éxito de la estrategia de regeneración. Por lo tanto, la selección de los materiales para la fabricación de andamios es crucial (16).

## **2.4. Regeneración ósea**

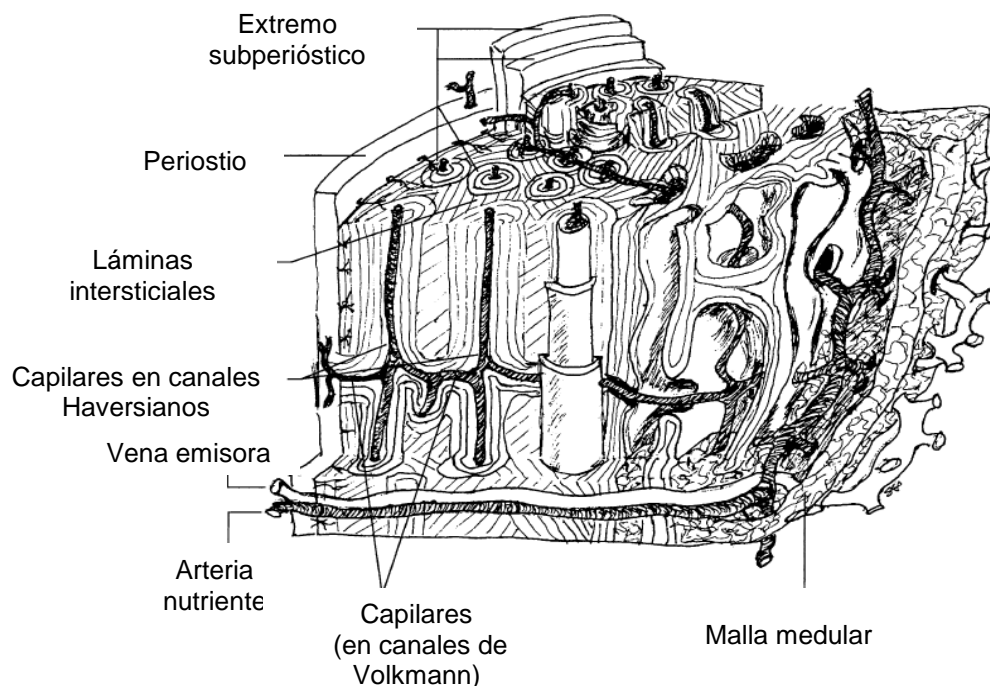
El cuerpo es capaz de reparar eficazmente las fracturas en los huesos. Estos defectos son a menudo reemplazados por hueso natural, incluso más resistente que el original. Sin embargo los defectos grandes generan más dificultades por lo que el cuerpo no los puede reparar. Otro tipo de defectos óseos

se pueden presentar como resultado de anomalías congénitas, traumatismos o alguna enfermedad.

El hueso es un tipo de tejido conectivo especializado. La matriz ósea consiste de colágeno tipo I y fosfato de calcio en la forma de hidroxapatita.

En la Figura 1 se observa el componente estructural principal del hueso compacto, llamada osteona, la cual está formada por matriz laminar concéntrica, un conducto cilíndrico llamado canal de Havers, que proveen acceso a los sistemas circulatorio y nervioso. Los canales de Volkmann que son transversales a los canales de Havers y proporcionan un camino para la nutrición del hueso.

Con la excepción de las superficies articulares, el hueso está cubierto por una delgada capa de tejido conectivo, periostio, que consiste principalmente de una capa de fibras ricas en colágeno y células osteoprogenitoras (17).



*Figura 1.* Dibujo a pluma de la estructura básica del hueso cortical que muestra sus principales componentes [modificado de Seal (17)].

Para logra inducir la regeneración de hueso, es importante tomar en cuenta los materiales implantados en el cuerpo humano, los cuales deben ser biocompatibles. Además los materiales deben ser moldeables, en el caso de los polímeros, deben estar completamente polimerizados o garantizar su polimerización *in situ*, lo anterior para asegurar un mejor relleno del defecto óseo. Los andamios deben proporcionar adhesión y crecimiento celular, mantener la diferenciación celular, proveer una matriz porosa a través de la cual los nutrientes y los desechos celulares se puedan difundir fácilmente y degradarse en subproductos biocompatibles. También es crucial que estos materiales tengan propiedades mecánicas similares al hueso natural (17).

## **2.5. Regeneración ósea guiada (ROG) y regeneración tisular guiada (RTG)**

La regeneración ósea guiada se refiere típicamente al aumento del reborde o a los procedimientos regenerativos óseos, se emplean técnicas de barrera, utilizando materiales tales como politetrafluoretileno expandido, poliglactina, poli ácido-láctico, sulfato de calcio y colágeno, con la esperanza de excluir el epitelio y el tejido conectivo de la raíz o de la superficie ósea existente, ya que interfieren con la regeneración (18)

Para realizar ROG es necesario contar con materiales que cumplan con los siguientes requisitos:

1. Biocompatibilidad.
2. Promuevan: la adhesión y la proliferación celular.
3. Integración a los tejidos y fácil manipulación.

Además, es necesario que permanezcan el tiempo suficiente para permitir la proliferación de los tejidos buscados (19).

La regeneración tisular guiada (RTG) utiliza membranas de porosidades variables alrededor del defecto periodontal, para prevenir la proliferación de tejido epitelial

en el espacio de la lesión y así permitir la regeneración de verdaderos tejidos periodontales, este proceso induce el reclutamiento de células progenitoras indiferenciadas o células troncales de los remanentes de ligamento periodontal sano. Al crear un espacio y dar tiempo a la regeneración de tejidos periodontales, la RTG es una técnica que muestra buenos resultados en ciertos escenarios; tras dos décadas de uso, análisis cuantitativos de los resultados clínicos muestran que la RTG es una alternativa exitosa y predecible solo en pocos casos, como en defectos angostos y en lesiones en furca clase II. Con el avance en las mejoras de los materiales como injertos y membranas se han ganado mejores resultados en la terapia de regeneración periodontal, sin embargo aún no es posible la total regeneración de los tejidos periodontales (20).

## **2.6. Andamios**

Las estrategias actuales de la medicina regenerativa se centran en la restauración de la arquitectura de tejidos, mediante el trasplante de células en combinación con andamios de soporte y biomoléculas. En años recientes se ha dado un interés considerable a los andamios biológicamente activos, que están basados en análogos de la matriz extracelular e inducen la síntesis de tejidos y órganos. Además, se pretende sembrar células y cultivarlas sobre andamios biodegradables con la finalidad de regenerar tejidos. En esta técnica, el andamio debe realizar una serie de funciones críticas. En primer lugar, debe proporcionar a las células una superficie adecuada para la adhesión, proliferación y diferenciación. En segundo lugar, el andamio debe proporcionar una red porosa para una distribución celular uniforme durante la siembra y para el transporte masivo de moléculas de señalización solubles, nutrientes y eliminación de desechos metabólicos. Por último, el andamio debe proporcionar una plantilla tridimensional que guíe el crecimiento del tejido para formar su estructura final con el crecimiento subsecuente hasta que los tejidos sean totalmente restaurados o regenerados (21,22).

Frente a un complejo sistema biológico y sensible como el cuerpo humano, los requisitos de los andamios para la ingeniería de tejidos son múltiples y extremadamente desafiantes. Primero, la biocompatibilidad de los materiales del sustrato es imperativa, es decir, el material no debe provocar una respuesta inflamatoria ni mostrar citotoxicidad. Además, las propiedades mecánicas del andamio deben ser suficientes y no colapsar durante la manipulación ni durante las actividades normales del paciente. Al igual que con todos los materiales en contacto con el cuerpo humano, los andamios se deben esterilizar fácilmente para prevenir una infección. Un requisito adicional, particularmente en la ingeniería ósea, es que deben tener una porosidad controlable para dirigir el crecimiento celular en la forma física deseada y para soportar la vascularización del tejido en crecimiento (23).

Actualmente, se están desarrollando compuestos poliméricos y cerámicos con el objetivo de aumentar la estabilidad mecánica del andamio y mejorar la interacción con el tejido. Además, se han realizado esfuerzos en el desarrollo de andamios con capacidad de liberación de fármacos. Estos andamios pueden liberar localmente factores de crecimiento o antibióticos mejorando así la regeneración del hueso en defectos óseos e incluso promover la cicatrización de heridas (23).

Otro factor crucial para el éxito a largo plazo en el desarrollo de un andamio es su tiempo de degradación. El rango de degradación puede afectar varios procesos celulares incluyendo crecimiento celular, regeneración tisular y respuesta del hospedero. El rango ideal de degradación no debe exceder el rango de formación ósea y la reducción en la fuerza del implante debe ser muy aproximada al incremento de la resistencia en el tejido, de otra forma el esfuerzo puede ser transferido al hueso regenerado, lo que puede afectar su reparación y los subproductos de su degradación deben ser biocompatibles (1,22).

## 2.7. Tipos de andamios

Los andamios pueden ser no absorbibles y absorbibles, los primeros en fabricarse fueron los no reabsorbibles, los cuales demandaban una segunda cirugía para su retiro, como los de politetrafluoretileno. Por lo que se buscó desarrollar andamios reabsorbibles, como los de poli ácido-glicólico, poli ácido-láctico y carbonato de trimetileno, que se reabsorben entre seis y catorce meses (7), los cuales tienen la ventaja de no requerir una segunda cirugía para su remoción. Las técnicas tradicionales de fabricación de andamios incluyen la producción de polímeros porosos por congelación-extracción y gelificación, electrohilado o con hidrogeles como sustratos para la fijación celular (25).

También existen los andamios de polímeros naturales y sintéticos, los primeros tienen la ventaja de contener información como por ejemplo secuencias de aminoácidos que facilitan la adhesión celular, por otro lado los polímeros sintéticos permiten el control preciso del peso molecular, tiempo de degradación, hidrofobicidad, de igual manera tienen la ventaja de ser producidos bajo condiciones controladas y pueden darles propiedades físicas predecibles y reproducibles como resistencia a la tracción, módulo elástico y rango de degradación, una ventaja adicional es el control de impurezas, sin embargo la interacción celular no se da de la manera deseada (21, 24).

Nuevas alternativas de materiales biodegradables se estudian realizando pruebas *in vitro* midiendo la pérdida de masa y el cambio en el pH dentro de una solución, esto para analizar la degradación de las fibras del polímero.

## 2.8. Andamios de poli (ácido-láctico) (PLA)

En la ingeniería de tejidos para lograr la regeneración tisular, existe un interés especial en el desarrollo de nuevos biomateriales funcionales capaces de

estimular una respuesta biológica necesaria para restablecer las funciones de un tejido dañado. Las estrategias recientes tratan de imitar la matriz extracelular de los tejidos del cuerpo humano mediante el uso de la nanotecnología (27).

En la década de 1970, los productos de poli ácido-láctico (PLA), fueron aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para el contacto directo con fluidos biológicos. Cuatro de sus ventajas más atractivas son la renovación, biocompatibilidad, procesabilidad y ahorro de energía. En primer lugar, el PLA se deriva de recursos degradables y renovables como el maíz y el arroz, lo que puede ayudar a aliviar la crisis energética así como reducir la dependencia de los combustibles fósiles de nuestra sociedad; el PLA y sus productos de degradación,  $H_2O$  y  $CO_2$ , no son tóxicos ni carcinogénicos para el cuerpo humano, lo que lo convierte en un excelente material para aplicaciones biomédicas (28).

El homopolímero del PLA es un polvo blanco a temperatura ambiente, con valores de  $T_g$  y  $T_m$  de  $55^\circ C$  y  $175^\circ C$  respectivamente, el PLA de alto peso molecular es un material termoplástico incoloro, brillante y rígido, similar al poliestireno.

Existen dos estereoisómeros del ácido láctico, L-ácido láctico y D-ácido láctico, (Figura 2), los cuales son necesarios para su síntesis (28).

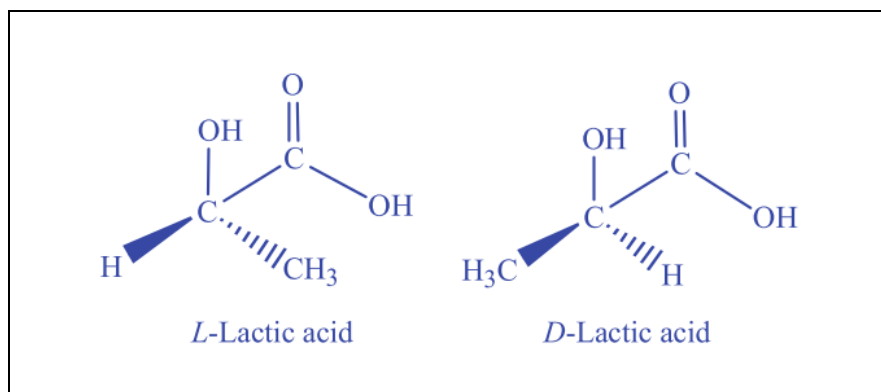


Figura 2. Estereoisómeros del ácido láctico [tomado de Lin Xiao (28)].



## 2.9. Técnica de hilado por propulsión de aire (AJS)

A pesar de que la técnica de electrohilado es la más comúnmente usada en la fabricación de nanofibras debido a su simplicidad y su relativo alto rendimiento. El bajo rango de producción y la dependencia de un suministro de alto voltaje son los principales dilemas, es por esto que los investigadores buscan otras técnicas para preparar las nanofibras.

La técnica de hilado por propulsión de aire (Figura 3) es un método con un rango de producción rápido para preparar nanofibras, en ésta técnica la propulsión del aire estira la solución del polímero y la expulsa en forma de fibras ultra delgadas. Simultáneamente debido a su velocidad y baja presión, el aire permite que los solventes se evaporen cuando estas son producidas (29).

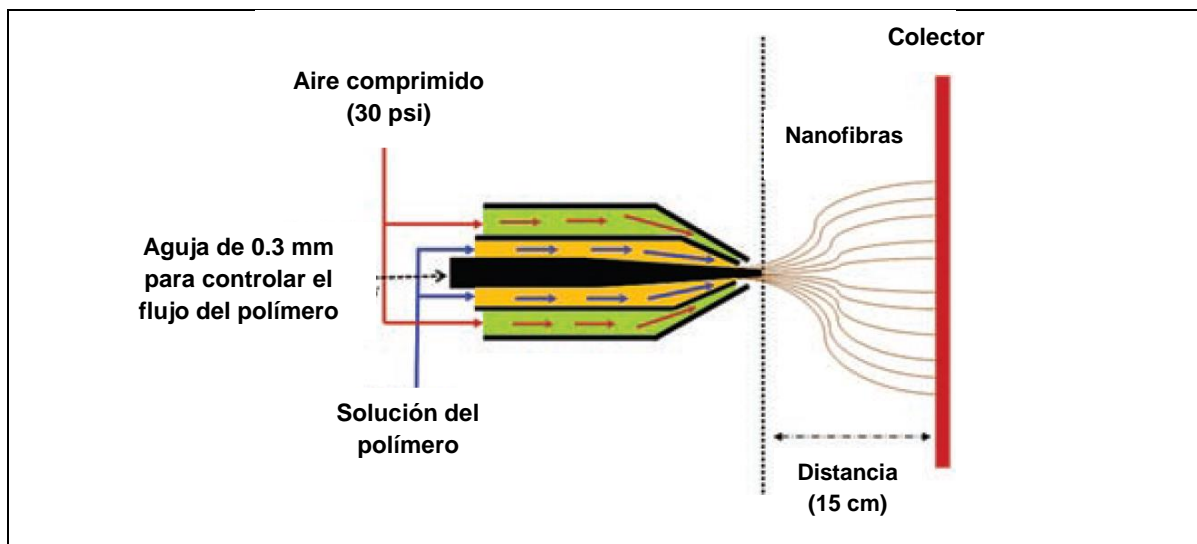


Figura 3. Esquema de la utilización de AJS [modificado de Abdal-Hay A (29)].

Esta técnica ofrece un bajo costo y una manipulación relativamente sencilla para la producción de nanofibras con resultados favorables, por lo que es una buena alternativa en la producción de andamios de polímeros entre ellos los de PLA.

### 3. Planteamiento del problema y justificación

Las alternativas terapéuticas actuales para la regeneración de tejidos, conllevan a la investigación de nuevos andamios que permitan, en primer lugar un arreglo en su superficie a escalas nanométricas, las cuales puedan imitar el entorno biológico, ya que las superficies al encontrarse en la misma escala que las moléculas biológicas, las células pueden reconocer y responder al medioambiente extracelular, produciendo señales químicas o estímulos físicos que desencadenan la apropiada respuesta de las mismas mediante la activación de distintos mecanismos moleculares y biológicos, los cuales conducen a división, migración, diferenciación, mantenimiento del fenotipo o apoptosis.

La actividad coordinada de estos procesos por parte de las células que forman un tejido y por consiguiente la diferenciación estructural y funcional, es determinada por la superficie de los andamios, sin embargo también es importante el tiempo de permanencia, el cual es de suma importancia para lograr el éxito de los tratamientos.

Por tal motivo, cuando se diseñan nuevos materiales, es de sumo interés evaluar el periodo de degradación, ya que lo ideal es que se degrade conforme el tejido se va regenerando, un ejemplo claro es el tejido óseo, ya que su velocidad de reparación es inferior a la de otros tejidos. Por lo tanto al evaluar la degradación de los andamios de PLA, *in vitro* y ver su respuesta *in vivo*, nos dará información importante, con la cual se decidirán los parámetros, con los cuales se pueda realizar medicina traslacional en animales de experimentación y en un futuro proponer en humanos.

## **4. Hipótesis**

El tiempo de degradación y las propiedades mecánicas de andamios fibrilares de PLA serán diferentes según el porcentaje de polímero, además de que ambos son biocompatibles.

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivos generales

- Evaluar la respuesta físico-química a la degradación de andamios hilados de PLA, así como valorar la respuesta histológica en tejido celular subcutáneo de ratas Wistar.

### 5.2. Objetivos específicos

- Diseñar y fabricar andamios de PLA al 7 y 10% por medio de la técnica de hilado por propulsión de gas.
- Evaluar la estructura superficial que presentan fibras de PLA al 7 y 10% (antes y después de someterlas en agua bidestilada y solución de Ringer), por medio de Microscopía Electrónica de Barrido.
- Analizar las propiedades mecánicas (módulo elástico y resiliencia) de los andamios de PLA periódicamente; después de estar en contacto con solución de Ringer y agua bidestilada.
- Valorar la respuesta biológica de las fibras en tejido celular subcutáneo de ratas *Wistar* a diferentes tiempos (8, 20, 40, 60, 80 y 100 días).

## **6. Metodología**

### **6.1. Diseño y elaboración de andamios de poli (ácido-láctico) (PLA)**

El PLA utilizado para la fabricación de los andamios fue de un peso molecular de 192,000 (Nature Works), se prepararon dos soluciones a una razón de 3:1, una correspondiente al 7% de PLA y otra al 10%, las cuales se describen a continuación:

Para la solución al 7% se pesaron 3.5 g de PLA, el cual se disolvió en 37.5 mL de cloroformo en agitación constante a 30°C durante 24 horas, posteriormente se agregaron 12.5 mL de etanol y se mantuvo en agitación por 30 minutos.

Para la solución al 10% se emplearon las mismas condiciones de agitación, tiempo y temperatura, utilizando 5 g de PLA disuelto en 37.5 mL de cloroformo y 12.5 mL de etanol.

#### **6.1.1. Depósito de las microfibras**

El equipo de hilado por propulsión de aire se encuentra dentro de una cámara plexiglás, con la finalidad de aislar el sistema de campos externos y evitar cambios en las condiciones durante el proceso de hilado.

Para generar las membranas, las soluciones de cada concentración se colocaron en un aerógrafo con una aguja de 0.3 mm de diámetro y una propulsión de 30 psi, dirigido a un colector recubierto con papel encerado en un área de 30 cm de largo por 6 cm de ancho, a una distancia de 15 cm (Figura 4), el depósito de las fibras se realizó teniendo sumo cuidado para que los andamios fueran lo más uniformes posible, para ello se realizaron depósitos durante 15 minutos de manera unidireccional (de izquierda a derecha) en un tiempo de 4 segundos de un lado a otro.

Una vez obtenidas las láminas de PLA, se colocaron en una campana de extracción para evaporar el solvente.



Figura 4. Fotografía de fabricación y depósito de fibras de PLA, fuente: elaboración propia

### 6.1.2. Diseño de las muestras

Las muestras de PLA (Figura 5) se recortaron de la lámina con un sacabocados de 9 mm de diámetro, obteniendo así muestras circulares, las cuales se usaron para las pruebas de degradación *in vitro* y la respuesta *in vivo*. Para las pruebas mecánicas se recortaron muestras rectangulares de 5 mm X 20 mm.



Figura 5. Frascos y muestras recortadas de PLA para pruebas *in vitro* y mecánicas fuente: elaboración propia

## **6.2. Esterilización de los andamios**

Todas las muestras ya recortadas se metieron en sobres para esterilizar (Tyvek®) y se etiquetaron según el porcentaje de PLA.

Las muestras fueron esterilizadas en óxido de etileno al 100% con una humedad entre el 40% y 70%, a presión negativa, siguiendo un ciclo frío (37 °C) durante 5 horas y un ciclo caliente (55 °C) durante dos horas. Finalmente las muestras fueron aereadas durante 12 horas para eliminar el gas retenido.

## **6.3. Pruebas de degradación *in vitro* de las fibras de PLA**

### **6.4. Soluciones control y experimental.**

Antes de comenzar los experimentos de degradación, se registraron los pesos iniciales de todos los andamios (Anexo A). Los andamios del grupo experimental se colocaron de manera individual en frascos ámbar con 25 mL de solución de Ringer, cada 100 mL de solución contienen: cloruro sódico (600 mg), lactato sódico (312 mg), cloruro potásico (40 mg) y cloruro cálcico dihidratado (27 mg), con pH 6.36. Los del grupo control se colocaron en las mismas condiciones, variando únicamente la solución, por agua bidestilada (pH 8.16). Todos los grupos (controles y experimentales) se metieron en una estufa Felisa a 37 °C durante 20, 40, 60, 80 y 100 días.

Se formaron 4 grupos para evaluar la pérdida de masa y 4 grupos para evaluar la estructura superficial de los andamios, cada grupo estaba integrado por tres muestras. La tabla 1 muestra los 8 grupos con un total de 24 muestras.

**Tabla 1.** Distribución de grupos para pruebas *in vitro*

Grupo	Peso y pH	Grupo	Evaluación de la estructura superficial
1	PLA 7% Experimental	5	PLA 7% Experimental
2	PLA 7% Control	6	PLA 7% Control
3	PLA 10% Experimental	7	PLA 10% Experimental
4	PLA 10% Control	8	PLA 10% Control

### 6.5. Evaluación del peso de los andamios

Para evaluar el cambio que presentaban los andamios con respecto al peso, se registró el peso inicial de las muestras y el peso cada 20 días hasta completar los registros de un total de 100 días. Los andamios se introducían en un desecador durante una hora previo a la medición del peso, garantizando así que las muestras estuvieran libres de humedad.

### 6.6. Evaluación del pH de las soluciones

Para evaluar si las muestras modificaban el pH de las soluciones, se midió con un potenciómetro (Mettler Toledo®), el pH de cada uno de los grupos antes de colocar el andamio y cada 20 días hasta completar los 100 días, los datos se registraron en tablas de datos (Anexo A).

### 6.7. Pruebas mecánicas

Para estas pruebas se usaron andamios rectangulares de 5 mm por 20 mm, mismos que se sumergieron en 65 mL de agua bidestilada (control) y 65 mL de



solución de Ringer (experimental) contenidos en frascos ámbar. Estas concentraciones se calcularon según el volumen de la muestra (30).

Las pruebas mecánicas se realizaron en el Laboratorio de Materiales Dentales (DEPeI) usando la máquina universal de pruebas mecánicas (INSTRON® 5567) en condiciones ambientales, a una velocidad de prueba de 1 mm/min en modalidad de tensión.

Se evaluaron las muestras cada 20 días hasta completar los 100 días, previamente las muestras se desecaron en un vacuum durante una hora para garantizar que estuvieran libres de humedad, posteriormente se midió el espesor de cada una de ellas con un micrómetro, los datos se registraron en tablas de datos (anexo D).

Las propiedades a evaluar fueron: módulo elástico y resiliencia.

El módulo elástico se obtuvo de la gráfica esfuerzo-deformación (sección recta).

Los valores de esfuerzo se obtuvieron al dividir la fuerza en Newtons (N) proporcionada por la máquina INSTRON® entre el área transversal de cada andamio ( $A = (5) (20) = 100 \text{ mm}^2$ ); el esfuerzo se reporta en Mega Pascales (MPa).

La deformación se obtuvo al dividir el desplazamiento en mm proporcionado por la máquina INSTRON® entre la longitud inicial de cada andamio ( $L_0$ ). Las unidades se reportaron como mm/mm.

Todos y cada uno de los puntos de la gráfica fuerza-desplazamiento proporcionados por la máquina de pruebas mecánicas se calcularon para obtener la curva esfuerzo-deformación.

El módulo elástico se calculó al obtener la pendiente de la sección lineal de la curva esfuerzo-deformación; las unidades se reportaron en MPa.

La resiliencia fue calculada como el área bajo la sección lineal de la curva esfuerzo-deformación, esta área representa un triángulo y su área fue: base (deformación) por altura (esfuerzo) dividida entre 2; las unidades se reportaron en  $\text{mJ}/\text{mm}^3$ .

## **6.8. Evaluación de la estructura superficial**

La estructura superficial se evaluó con Microscopía Electrónica de Barrido a bajo vacío (JEOL JSM 5600), al inicio y al final del periodo experimental, con la finalidad de no manipular demasiado la muestra y poder observar los cambios debido a la degradación y no a la manipulación de éstas.

## **6.9. Pruebas *in vivo* (respuesta inflamatoria en ratas de la cepa Wistar)**

Por su disponibilidad, tamaño adecuado, manipulación asequible al momento de operar, por la poca complejidad que implica su hábitat y cuidados, se utilizaron 24 ratas de la cepa *Wistar*, machos adultos de 12 semanas de edad, de 250g a 300 g, las cuales se dividieron de manera aleatoria para formar 6 grupos, se siguieron los parámetros de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO1999 (31). Además de los procedimientos establecidos por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Las ratas se sedaron y tranquilizaron con Ketamina (80 mg/kg) y Xilacina (10mg/kg), ambas por vía intramuscular, se rasuró el lomo de la rata y se realizó antisepsia de rutina, posteriormente se realizaron 3 colgajos triangulares de 2 cm aproximadamente, uno superior derecho, donde se colocó la muestra del 7% uno superior izquierdo, donde se colocó la de 10% y en la parte inferior derecha se colocó Gelfoam como control (Figura 6A).

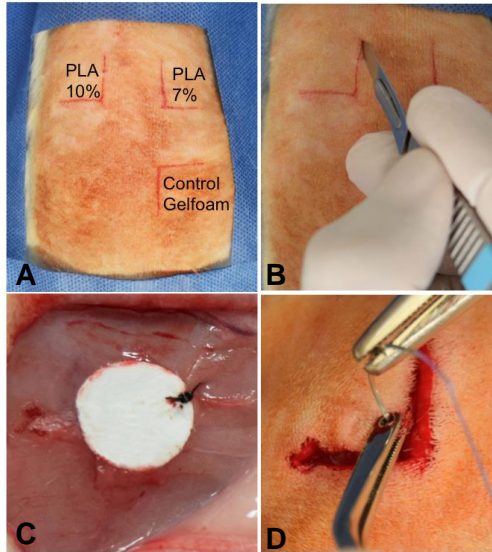


Figura 6. Diagrama de Posición de muestras *in vivo*.

- A. Distribución de las muestras en el lomo del espécimen.
- B. Incisiones en el lomo del espécimen.
- C. Sutura de la muestra a la dermis con nylon 5-0.
- D. Sutura del colgajo con VICRYL™ 3-0.

Cada muestra (andamio) se suturó a la dermis con Nylon 5-0 con el objetivo de estabilizar la muestra y no perder su posición (Figura 6C). Los colgajos se afrontaron por medio de puntos simples con VICRYL™ 3-0 (Figura 6D).

Se realizó un seguimiento clínico postquirúrgico, donde se valoró una serie de parámetros: estado general del modelo animal, aspecto de la herida, presencia de sangrado, exudado, colecciones o extrusión de los andamios.

Los procedimientos quirúrgicos y el cuidado de los animales, se realizaron en la Unidad de Bioterio de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de Facultad de Odontología, los cuales contaron con un fotoperiodo de 12 horas, con temperatura de 22°C y humedad relativa de 50%, siendo su alimentación (Rodent diet 5001) y agua *ad libitum*.

## 6.10. Sacrificio de los modelos animales

Al finalizar los tiempos establecidos 8, 25, 40, 60, 80 y 100 días (Tabla 2) los animales se sacrificaron mediante sobredosis de cloroformo hasta llegar al paro cardiorrespiratorio. Posteriormente se cortó la zona, donde se colocaron los

andamios y el Gelfoam, teniendo un margen de seguridad de 3 mm y se fijaron por 24 h en formol al 10%. A continuación se procesaron histológicamente en el Laboratorio de Patología Experimental (DEPeI) Facultad de Odontología UNAM. Las muestras se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) para su evaluación en microscopía óptica. En la tabla 2 se pueden observar los tiempos de sacrificio de los modelos animales.

En todos los tiempos establecidos se evaluó el estado general del animal.

<b>Tabla 2.</b> Calendario de tiempo de sacrificio de los animales de experimentación		
<b>Grupo</b>	<b>Día de Sacrificio</b>	<b>Características</b>
1	Día 8	Se evaluó el estado y si existía respuesta inflamatoria aguda.
2	Día 25	Se evaluó el estado y si existía respuesta inflamatoria crónica.
3	Día 40	Se evaluó el estado de la muestra.
4	Día 60	Se evaluó el estado de la muestra.
5	Día 80	Se evaluó el estado de la muestra.
6	Día 100	Se evaluó el estado de la muestra.

### **6.11. Análisis estadístico**

Los datos se analizaron de manera estadística por medio de análisis de varianza (ANOVA) por una vía mediante el programa estadístico SPSS.

## 7. Resultados

### 7.1. Resultados *in vitro*

#### 7.1.1. Resultados de la evaluación del peso

Al ser comparadas las muestras de PLA según la concentración de polímero, se pudo observar que las del grupo de 7% tienen mayor peso con respecto a las del grupo de 10%, tanto en las muestras experimentales como en las muestras control (anexo B). Un aspecto importante, es que las muestras independientemente de la concentración de polímero, ganan ligeramente peso con el transcurso de los días (Figura 7); no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

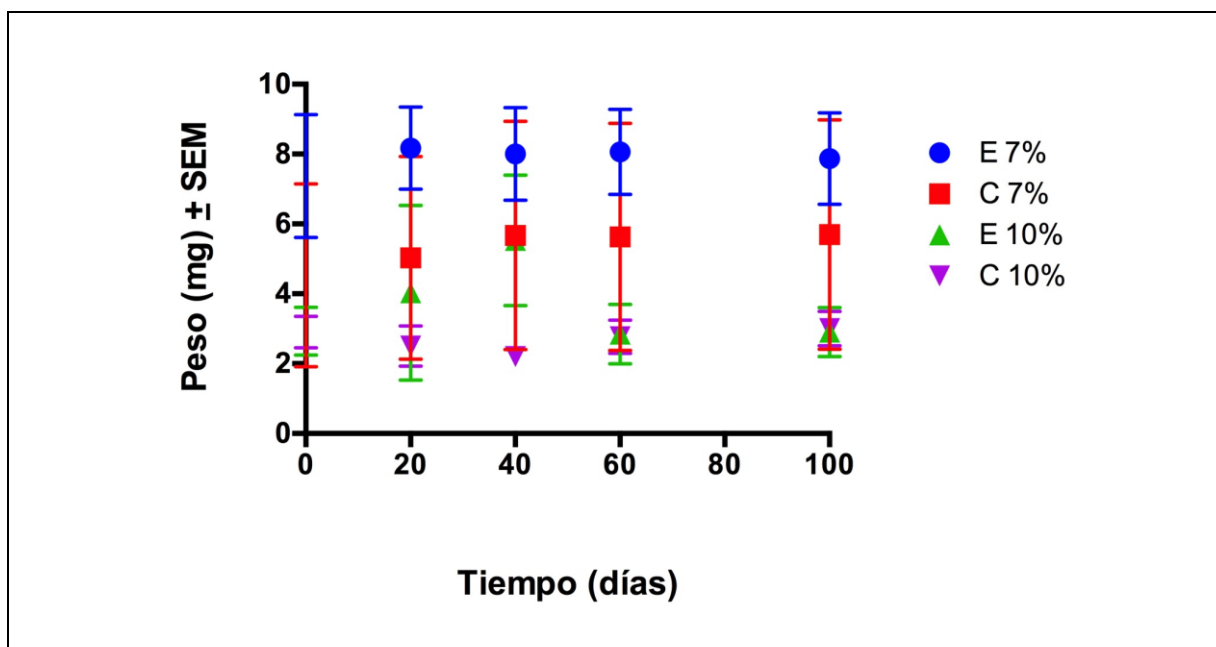


Figura 7. Resultados de evaluación de peso *in vitro*

### **7.1.2. Resultados de la evaluación del pH**

En la figura 8 se observa la modificación del pH con respecto al tiempo (0, 20, 40, 60, 80, y 100 días) de soluciones que estuvieron en contacto con andamios de PLA a diferentes concentraciones del polímero 7% y 10%, (anexo C).

El pH inicial fue de 6.36 para la solución de Ringer y de 8.16 para el agua bidestilada, el cual no se modifica en ausencia del andamio.

Ambas soluciones modificaron su pH al estar en contacto con los andamios, a partir de los 20 días.

La solución de Ringer mostró un aumento en el pH hasta alcanzar 6.77; mientras que el agua bidestilada disminuyó a un pH de 7.37.

Estos resultados sugieren que ambas soluciones tienden a neutralizar su pH en presencia de los andamios de PLA fabricados mediante la técnica AJS, independientemente de la concentración de polímero.

La modificación del pH fue más evidente a los 40 días, ya que a partir de ese momento se observó que todas las muestras tenían un pH muy similar entre ellas (entre 6.95 y 7.38) hacia los 100 días. No mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con el test de ANOVA.

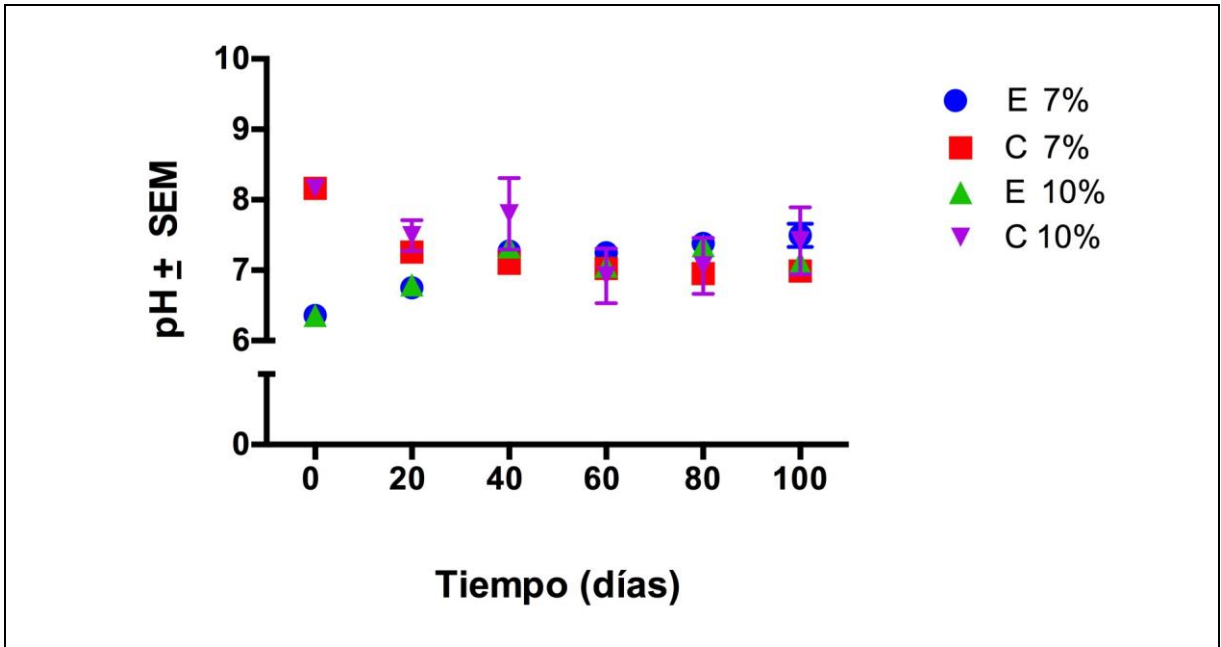


Figura 8. Resultados de evaluación de pH *in vitro*

### 7.1.3. Pruebas mecánicas

#### 7.1.3.1 Módulo elástico

La figura 9 muestra los resultados del comportamiento del módulo de elasticidad de las muestras de PLA a 7 y 10%, las cuales estuvieron sometidas al ensayo de tensión a diferentes tiempos después de estar en contacto con la solución de Ringer y agua bidestilada. Los resultados, (anexo E) demuestran que el módulo no se modificó significativamente con respecto a los periodos de tiempo, sin embargo se observó que el módulo elástico de las muestras del 10% de PLA es menor en comparación con las del 7 %, indicando que este último es más rígido en comparación con las del 10%. No se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con el test de ANOVA.

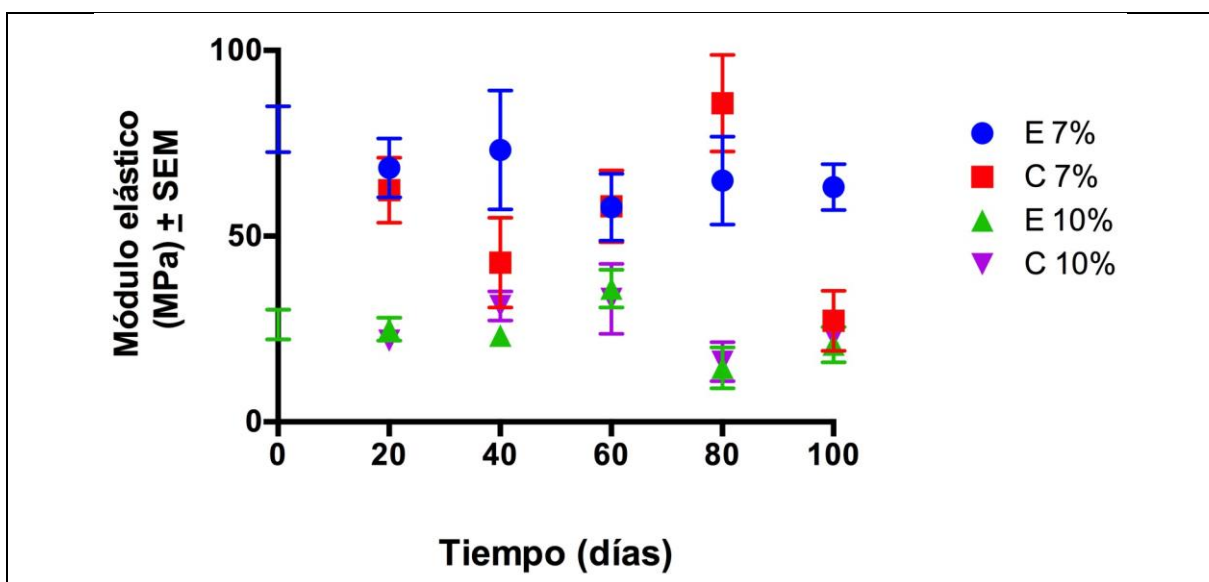


Figura 9. Resultados de módulo elástico



### 7.1.3.2 Resiliencia

En la figura 10 se puede observar la energía de deformación de las muestras de PLA al 7 y 10% con respecto al tiempo, sometidas a solución de Ringer y agua bidestilada. Los resultados, (anexo E) demuestran que el comportamiento de la resiliencia de las muestras es muy heterogéneo con respecto al tiempo, sin embargo ambos medios de degradación influyeron en los andamios ya que se necesitó menor energía para lograr la deformación elástica máxima, independientemente de la concentración de PLA. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos con el test de ANOVA.

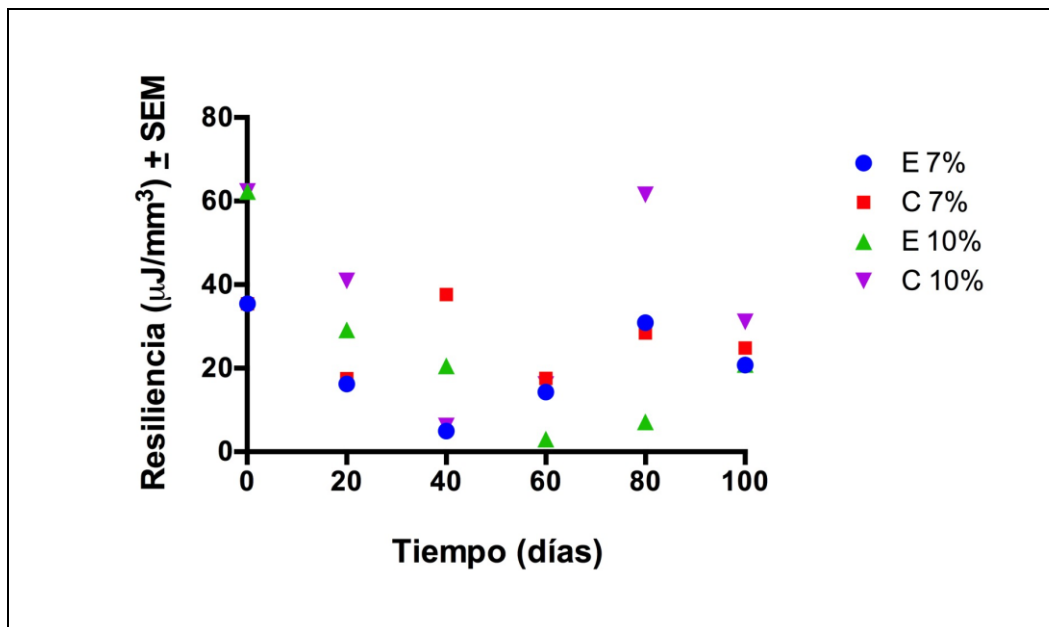


Figura 10. Resultados de resiliencia

#### 7.1.4. Estructura superficial

Se obtuvieron imágenes por microscopía electrónica de barrido de las muestras de PLA al 7% y 10% únicamente del día cero (antes de sumergir los andamios en las soluciones) y después de 100 días, tanto experimentales, como controles.

Mediante el software Image J<sup>®</sup> se midió el diámetro de las micro y nanofibras de las muestras experimentales y controles de PLA al 7% y 10%, con lo cual se determinó el diámetro promedio de dichas fibras, (anexo F), los resultados son los siguientes:

Se observa que inicialmente el grosor de las fibras de PLA al 7% varían en diámetros de entre 0.2  $\mu\text{m}$  hasta 0.9  $\mu\text{m}$  con un promedio de diámetro de 0.54  $\mu\text{m}$  (Figura 11A) al iniciar el estudio, al finalizar las pruebas (100 días) las muestras en contacto con la solución de Ringer (experimentales), mostraron un diámetro de las fibras de 0.2  $\mu\text{m}$  a 0.9  $\mu\text{m}$  con un promedio de 0.57  $\mu\text{m}$  (Figura 11B).

Las muestras que estuvieron en contacto con agua bidestilada (control), después de 100 días presentaron un diámetro de entre 0.1  $\mu\text{m}$  a 0.9  $\mu\text{m}$  con un promedio de 0.48  $\mu\text{m}$  (figura 11C). Mostrando diferencias significativas en el grosor de las fibras dependiendo de la concentración del polímero, teniendo menor diámetro las fibras al 7% que las fibras al 10%.

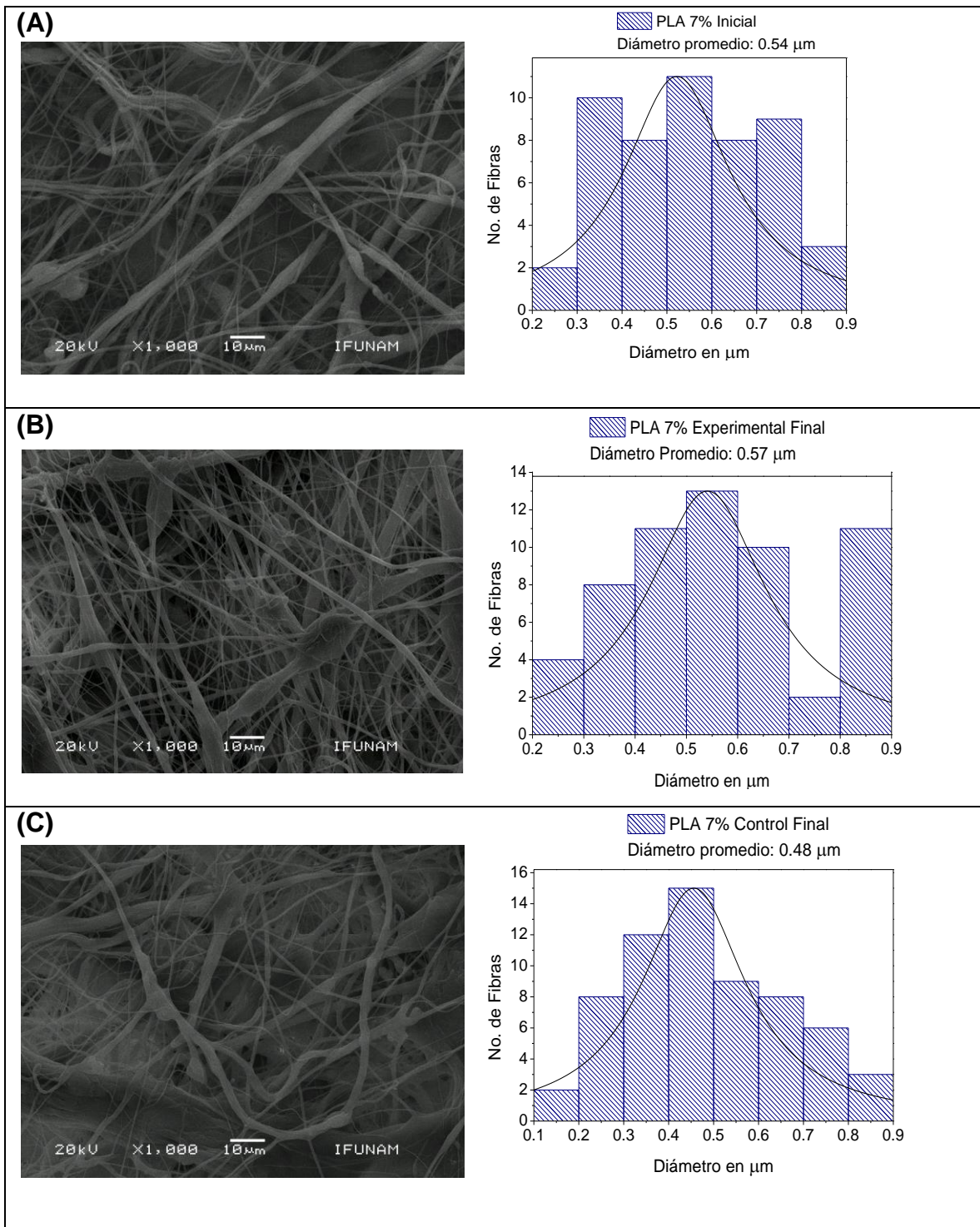


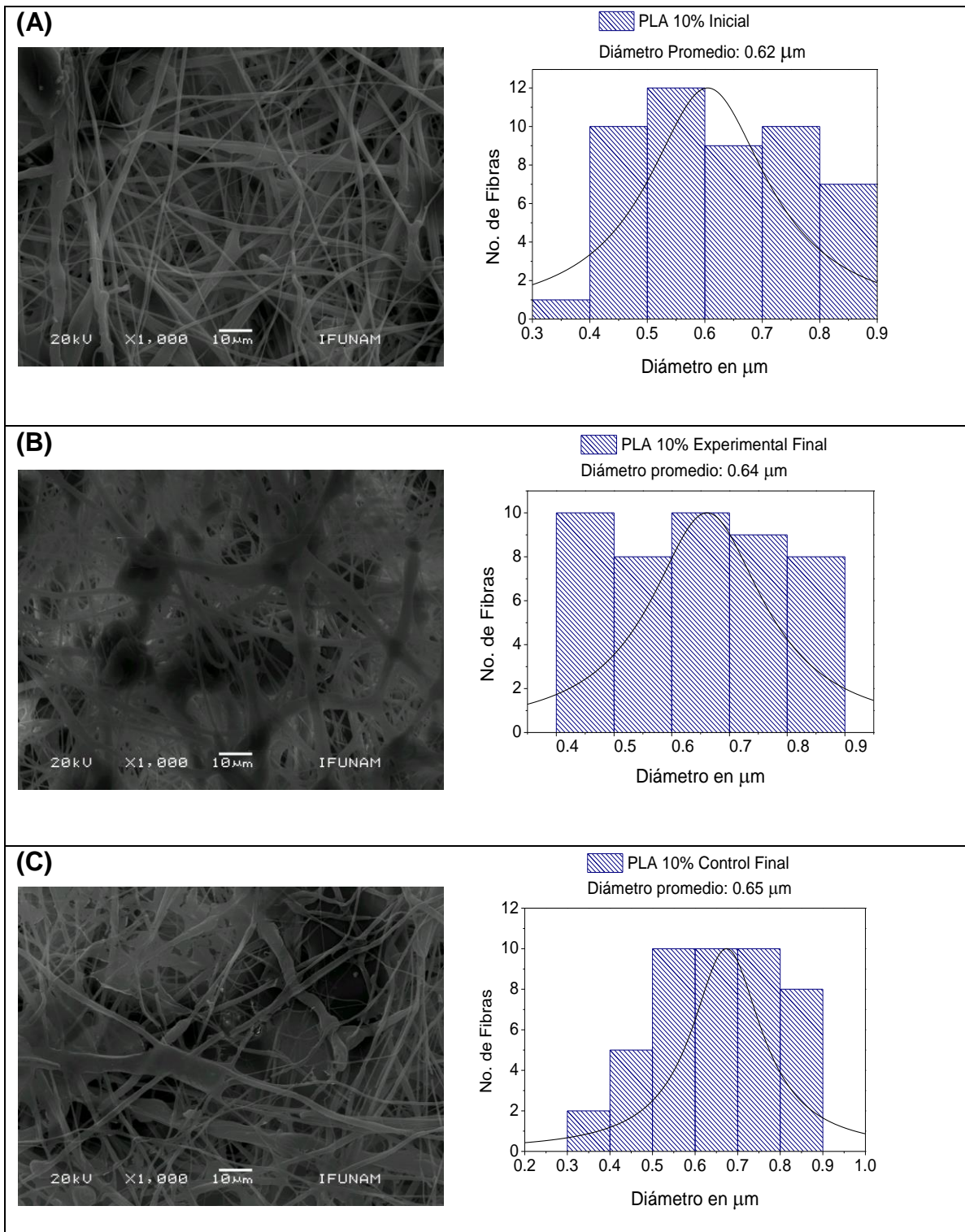
Figura 11. **(A)** Fotomicrografía en microscopía electrónica de barrido (MEB) a 1000 aumentos y 20kV de la muestra de PLA 7% inicial y gráfica del diámetro promedio de nanofibras. **(B)** Fotomicrografía observada en MEB a 1000 aumentos y 20 kV de la muestra de PLA 7% experimental final y gráfica del diámetro promedio de nanofibras. **(C)** Fotomicrografía observada en MEB a 1000 aumentos y 20 kV de la muestra de PLA 7% control final y gráfica del diámetro promedio de nanofibras.

En la figura 12 se observa que inicialmente las fibras de PLA al 10% tuvieron un diámetro de entre 0.3  $\mu\text{m}$  hasta 0.9  $\mu\text{m}$  con un promedio de 0.62  $\mu\text{m}$  (Figura 12A), al finalizar el estudio (100 días) las muestras que estuvieron en la solución de Ringer (Figura 12B), tuvieron en un grosor de 0.4  $\mu\text{m}$  a 0.9  $\mu\text{m}$  con un promedio de 0.64  $\mu\text{m}$ . Las fibras de las muestras que estuvieron en agua bidestilada (control), después de 100 días, tuvieron un grosor en diámetro de entre 0.3  $\mu\text{m}$  a 0.9  $\mu\text{m}$  con un promedio de 0.65 $\mu\text{m}$  (Figura 12C).

En el caso de las fibras de PLA al 10% el diámetro varía ligeramente con un rango de 0.3  $\mu\text{m}$  a 0.9  $\mu\text{m}$  con un promedio de 0.62  $\mu\text{m}$  de grosor esto se puede ver en las imágenes 11 y 12 respectivamente.

Mostrando que las nanofibras de polímero en una concentración al 10%, tienen un diámetro mayor que al 7% y que al estar en contacto con la solución Ringer, dichas fibras aumentaron su diámetro.

En el caso de las que estuvieron en contacto con agua bidestilada redujeron su diámetro.



**Figura 12.** (A) Fotomicrografía observada en microscopia electrónica de barrido (MEB) a 1000 aumentos y 20 kV de la muestra de PLA 10% inicial y gráfica del diámetro promedio de nanofibras. (B) Fotomicrografía observada en MEB a 1000 aumentos y 20 kV de la muestra de PLA 10% experimental final y gráfica del diámetro promedio de nanofibras. (C) Fotomicrografía observada en MEB a 1000 aumentos y 20 kV de la muestra de PLA 10% control final y gráfica del diámetro promedio de nanofibras.

## 7.2. Resultados *in vivo*

### 7.2.1. Respuesta histológica a los 8 días

En la figura 13 se observan fotomicrografías correspondientes al primer periodo de tiempo de los cortes teñidos con hematoxilina-eosina correspondientes a PLA 7% (Figura 13 A y B) los cuales muestran, infiltrado inflamatorio leve y tejido conectivo denso con vasos sanguíneos congestivos. En PLA 10% (Figura 13 C y D) se observa disposición longitudinal de las fibras de colágena, escaso infiltrado inflamatorio mononuclear entre estas y congestión vascular. En Gelfoam (Figura 13 E y F) se observa el material rodeado por tejido laxo, de aspecto edematoso con disposición irregular de las fibras de colágena.

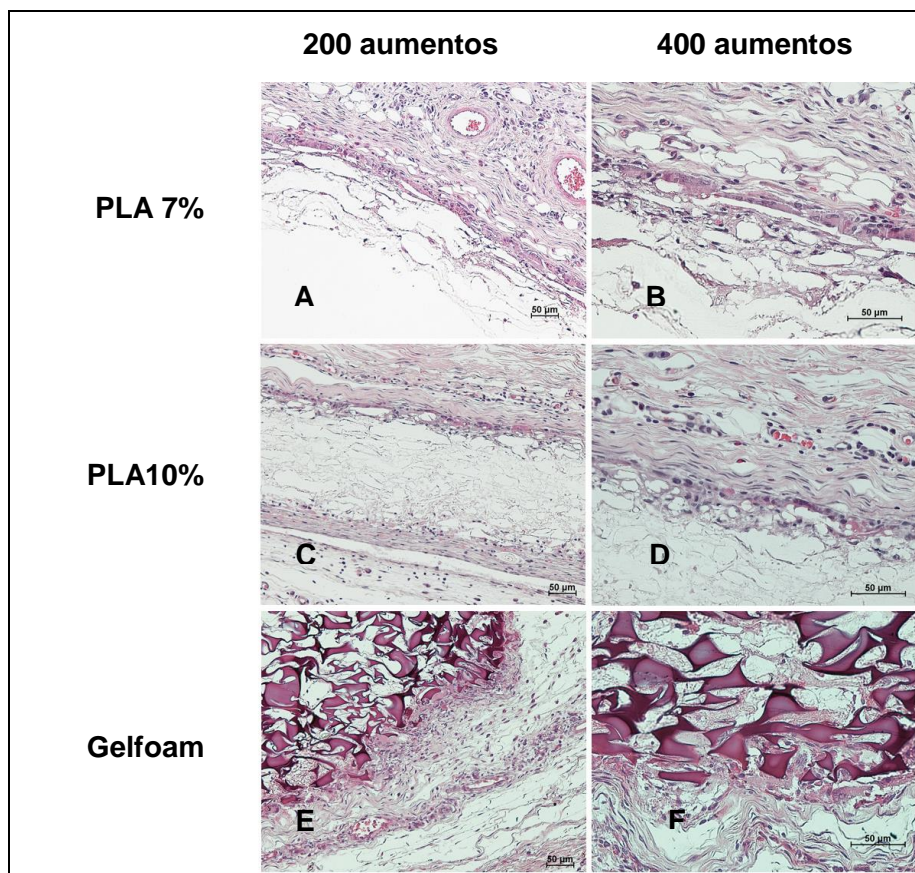


Figura 13. Fotomicrografías de muestras histológicas teñidas con HE de los andamios de PLA a 7% (A, B), al 10% (C, D) así como del control de Gelfoam (E, F) a los 8 días posteriores a la implantación en el modelo animal

### 7.2.2. Respuesta histológica a los 20 días

En la respuesta histológica a los 20 días (Figura 14) en PLA 7%, se pueden observar fibras de colágena organizadas, las cuales se identifican con mayor densidad, se puede apreciar que hay disminución en el número de vasos sanguíneos en comparación a los 8 días. En PLA 10% (Figura 14 C y D), se observa colágena densa con infiltrado inflamatorio mononuclear entre las fibras, así como también la presencia de vasos congestivos. En el control (Figura 14 E y F), se observa la presencia de este material el cual presenta infiltrado inflamatorio constituido principalmente por linfocitos y formación de células gigantes tipo cuerpo extraño, se encuentran depósitos de colágena irregular con proliferación de canales vasculares.

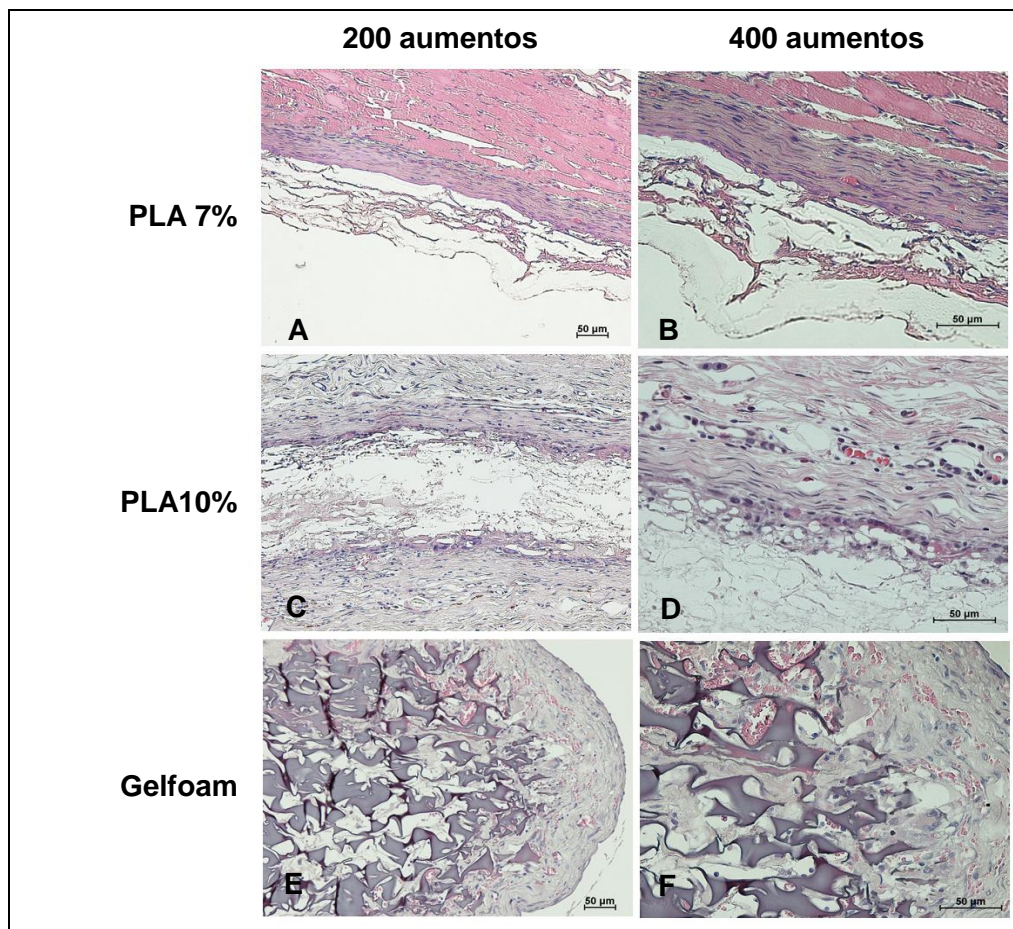


Figura 14. Fotomicrografías de muestras histológicas teñidas con HE de los andamios de PLA a 7% (A, B), al 10% (C, D) y del control de Gelfoam (E, F) a los 20 días posteriores a la implantación en el modelo animal

### 7.2.3. Respuesta histológica a los 40 días

En la figura 15 se observan fotomicrografías teñidas con HE de los tejidos correspondientes a los andamios y al control, en el corte correspondiente al de PLA 7% (Figura 15 A y B), se observa una pared de tejido fibroso con fragmentación de las fibras, en la luz se identifican escasas fibras de colágena. En PLA al 10% (Figura 15 C y D), se aprecia una cápsula de tejido conectivo denso con edema intersticial, en la luz hay depósito de fibras de colágena. En la muestra de Gelfoam (Figura 15 E y F), se observa presencia de material con depósito de tejido conectivo denso.

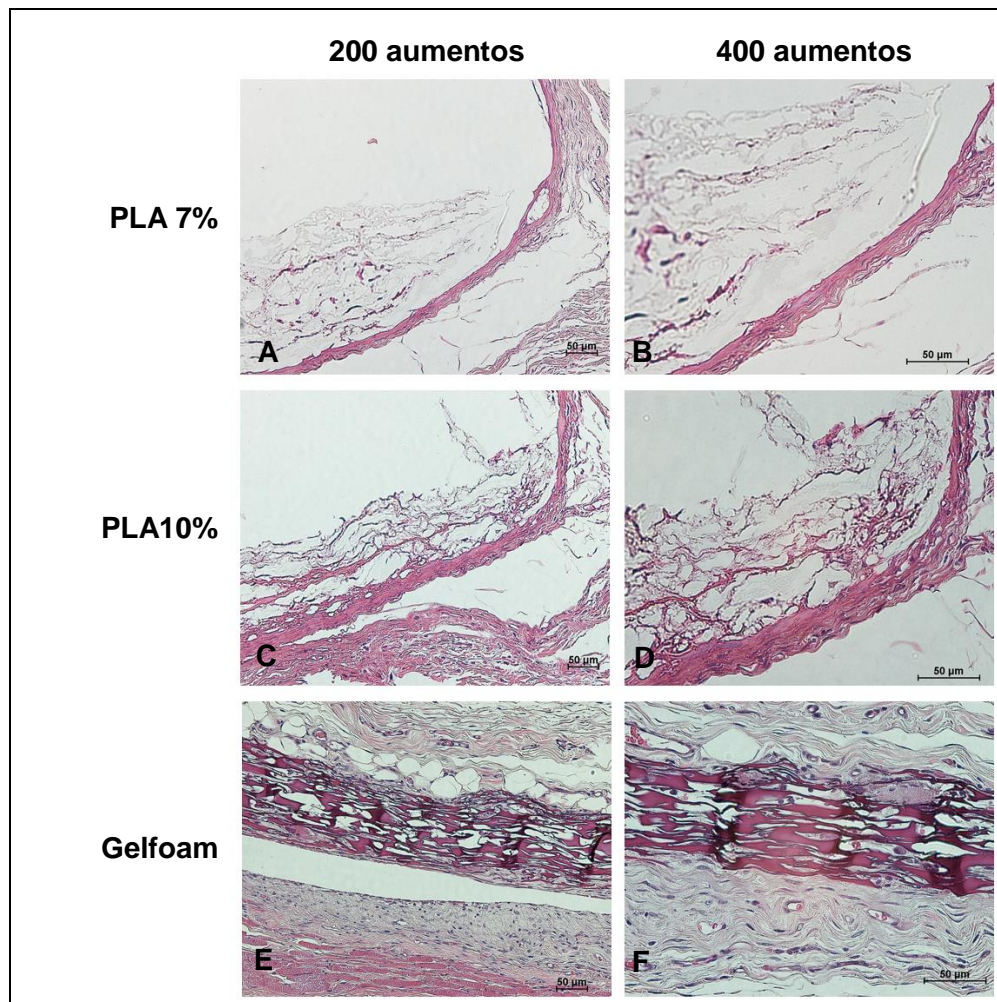


Figura 15. Fotomicrografías de muestras histológicas teñidas con HE de los andamios de PLA a 7% (A, B), al 10% (C, D) y del control de Gelfoam (E, F) a los 40 días posteriores a la implantación en el modelo animal



#### 7.2.4. Respuesta histológica a los 60 días

En los resultados a los 60 días (Figura 16), las imágenes correspondientes a PLA 7% (Figura 16 A y B), se identificó una cápsula de tejido conectivo denso, con fibras de colágena en disposición horizontal, la luz con escaso depósito de fibrina. En las imágenes correspondientes a PLA 10% (Figura 16 C y D), se identificó intenso infiltrado inflamatorio linfocitario con abundantes células gigantes tipo reacción a cuerpo extraño. En el grupo de Gelfoam (Figura 16 E y F), se identificó depósito de colágena densa sin evidencia ya del material o pared fibrosa.

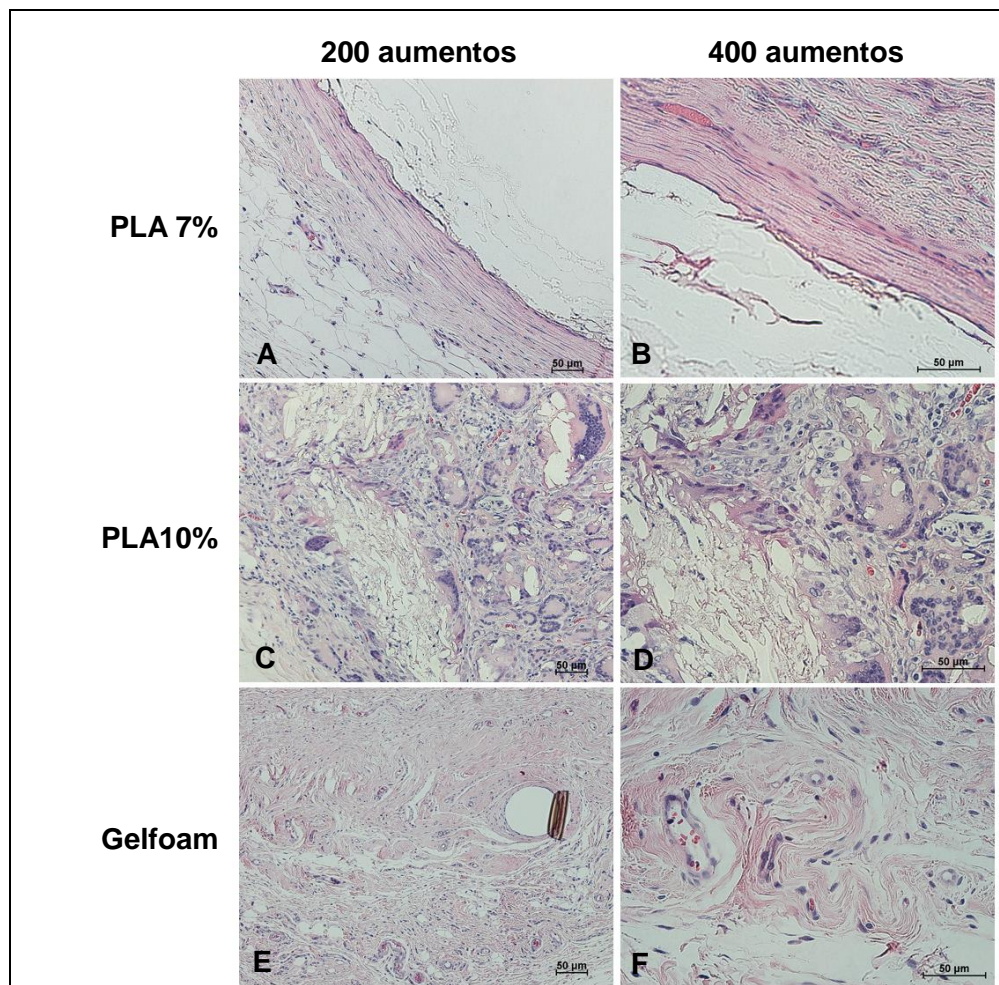


Figura 16. Fotomicrografías de muestras histológicas teñidas con HE de los andamios de PLA a 7% (A, B), al 10% (C, D) y del control de Gelfoam (E, F) a los 60 días posteriores a la implantación en el modelo animal

### 7.2.5. Respuesta histológica a los 80 días

En la figura 17 se observan fotomicrografías teñidas con HE de los cortes correspondientes a los 80 días postquirúrgicos. En el andamio correspondiente a PLA 7% (Figura 17 A y B), se identifica una cápsula de tejido conectivo laxo con luz que muestra escasas bandas de fibrina. En los andamios correspondientes a PLA10% (Figura 17 C y D), se observa depósito de tejido conectivo denso de forma irregular, la luz presenta fibras irregulares de colágeno con proliferación de algunos vasos sanguíneos. En las fotomicrografías correspondientes a Gelfoam (Figura 17 E y F), se observó un depósito denso de colágena y en algunas zonas hialinizadas.

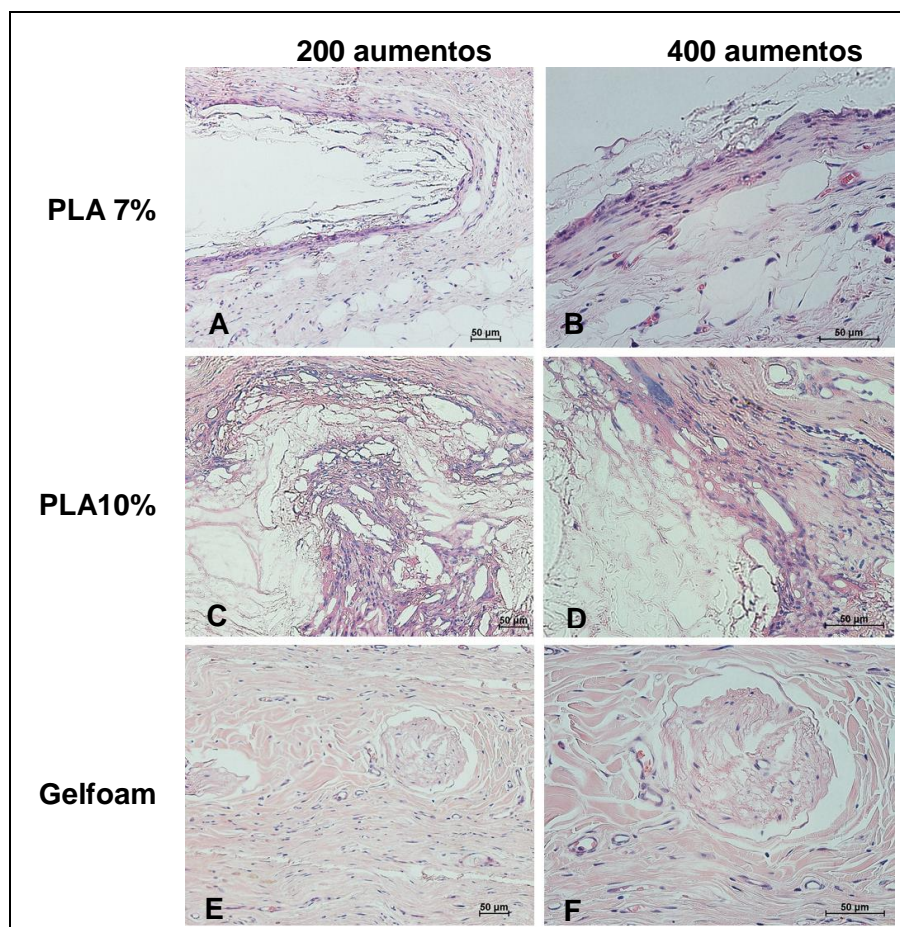


Figura 17. Fotomicrografías de muestras histológicas teñidas con HE de los andamios de PLA a 7% (A, B), al 10% (C, D) así como del control de Gelfoam (E, F) a los 80 días posteriores a la implantación en el modelo animal

### 7.2.6. Respuesta histológica a los 100 días

En la figura 18 se observan fotomicrografías a diferentes aumentos de los andamios al 7%, 10% y control, en los cortes correspondientes al PLA 7% (Figura 18 A y B), se identificó una pared de tejido conectivo denso con infiltrado inflamatorio linfocitario, escasas células gigantes multinucleadas con fragmentación de las fibras de colágena, la luz continúa con escaso depósito de fibrina. En los cortes correspondientes a PLA 10% (Figura 18 C y D), se observó una pared de tejido conectivo. La luz está ocupada por depósito de colágena densa con proliferaciones de canales vasculares. En los cortes control (Figura 18 E y F), se identificó colágeno denso hialinizado, sin evidencia del material, lo que se alcanza a observar es el espacio de la sutura.

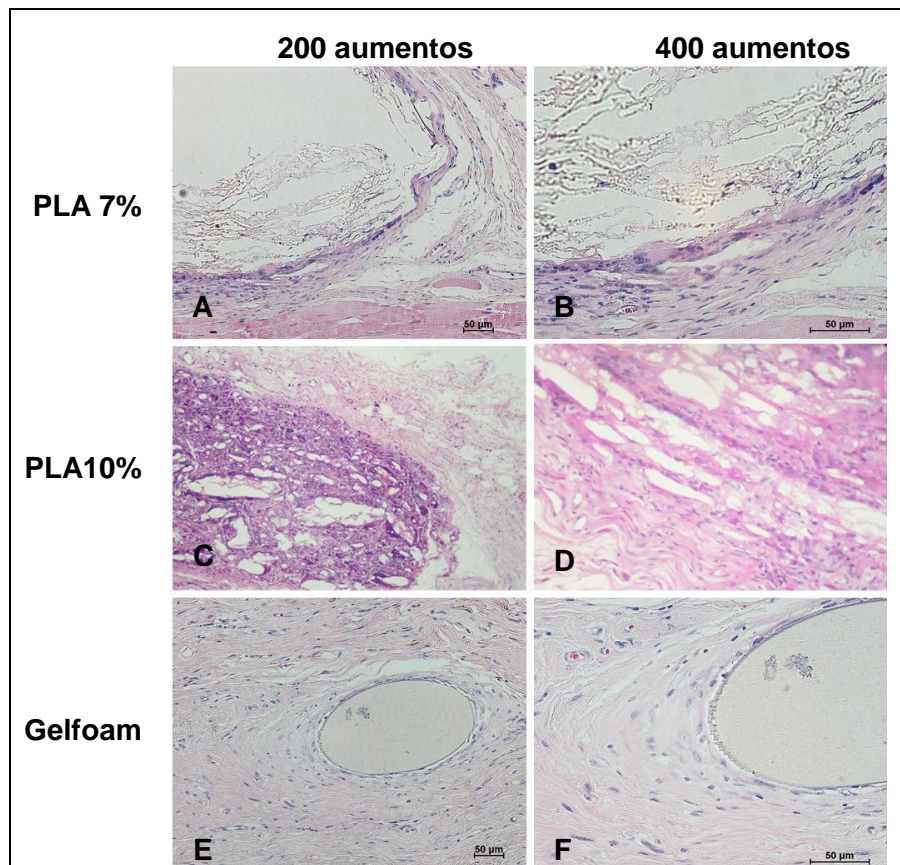


Figura 18. Fotomicrografías de muestras histológicas teñidas con HE de los andamios de PLA a 7% (A, B), al 10% (C, D) y del control de Gelfoam (E, F) a los 100 días posteriores a la implantación en el modelo animal

## 8. Discusión

Los andamios para ser empleados en la regeneración de tejidos, tienen diversos requerimientos presentando grandes retos al ser implantados en un sistema biológico complejo como es el cuerpo humano. Entre los requerimientos uno de los más importantes es que deben ser imperativamente biocompatibles, es decir, que no presenten una reacción inflamatoria severa y no muestren citotoxicidad, además de inducir la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Las propiedades mecánicas de los andamios deben ser lo más parecidas a las propiedades del tejido que se pretenda regenerar, ya que no deben colapsar durante su manipulación, ni durante las actividades normales del paciente, así como también deben ser fácilmente esterilizables para prevenir infecciones al entrar en contacto con el cuerpo humano (23).

El propósito de este proyecto fue analizar la biocompatibilidad, tiempo y características de degradación de andamios de PLA a 7 y 10% de polímero, el objetivo a futuro es poder emplear dichos andamios en la regeneración tisular, por ejemplo en regeneración ósea, lo cual permitiría obtener resultados predecibles y favorables en los tratamientos para defectos óseos maxilofaciales.

De igual manera los subproductos de degradación deben ser biocompatibles, el PLA se degrada mediante vías metabólicas naturales por hidrolisis, lo que lo hace un material adecuado al entrar en contacto con el cuerpo humano.

Un factor importante para el éxito de un andamio es la degradación, la cual afecta la interacción celular, proliferación celular, síntesis del tejido y la respuesta del hospedero; una característica deseable en un andamio es la sincronización de la degradación del material del que está formado con el remplazo del tejido natural producido (32).

En el caso de los andamios de PLA, la degradación a los 100 días fue casi imperceptible, los resultados mostraron un ligero aumento de peso en los andamios a lo largo del estudio. Sin embargo, el incremento en el peso no mostro diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales comparados con el control.

Nuestros resultados concuerdan con los de Felfel y col. (2000) donde demuestra que las fibras de poli ácido-láctico y policaprolactona (PLA-PCL) no modifican significativamente su peso en el medio salino tamponado con fosfatos (PBS) a 37°C después de 100 días (30). Similar a los resultados en el presente estudio.

De igual manera Lu y col. (2000), en sus estudios sobre degradación de andamios de poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA) en una proporción 85:15 respectivamente, tampoco mostraron cambios significativos en el peso después de 140 días (33), todo lo anterior en conjunto con los resultados del presente estudio indica que los andamios que contienen PLA tienen un tiempo de degradación superior a los 100 días.

En el caso de las pruebas de pH de las soluciones, se observó que la solución experimental (Ringer) con un pH inicial de 6.36 fue aumentando hasta llegar a un pH de 7.49 y 7.1 para el 7 y 10% respectivamente a los 100 días, este fenómeno es debido probablemente a que los iones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  y lactato de la solución de Ringer entran en contacto con la concentración de iones de hidrógeno de la muestra, produciendo un efecto amortiguador (equilibrio ácido-base), haciendo al andamio de PLA independientemente de la concentración, un buen candidato para utilizarlo en tejidos, ya que debido a este efecto, no habrá daños por acidez a nivel tisular.

Este fenómeno no se observa en los resultados de Felfel y col. y de Lu y col. (2000) ya que ellos emplearon únicamente PBS el cual estaba a un pH de 7.4. Por otro lado nuestro control fue colocar las muestras en agua bidestilada, la cual tiene

un pH inicial de 8.16, el cual se modificó de igual manera hacia la neutralidad al estar en contacto con las muestras de PLA sin importar la concentración del polímero, ya que en ambos casos el pH disminuyó a 6.98 y 7.74 para el 7% y 10% respectivamente después de 100 días. Este cambio es debido probablemente a que en pH básicos el monómero residual, aunque sea mínimo, es capaz de modificar el pH a neutro (32).

En la estructura superficial se midió el diámetro de las micro y nanofibras, observando que las muestras correspondientes al PLA 7% presentaron un menor diámetro promedio, el cual fue de 0.54  $\mu\text{m}$  en comparación con las del PLA al 10%, que tuvieron un diámetro promedio de 0.62  $\mu\text{m}$ , lo que nos indica un cambio en el grosor de las fibras dependiendo de la concentración del polímero, estos resultados concuerdan con los reportados por Granados y col. (2017) en estudios previos *in vitro* donde midieron el diámetro de andamios fibrilares de PLA al 7% y 10%. Nuestros resultados y los de Granados y col. coinciden en que la técnica de hilado por propulsión de aire (AJS por sus siglas en inglés) permite producir fibras con morfología homogénea, independientemente de la concentración del polímero (34).

Las propiedades que deben de cumplir los andamios de PLA como biocompatibilidad, porosidad, estructura superficial, son susceptibles de ser manipuladas, de tal manera que dependiendo el fin de su uso se pueden adaptar y obtener mejores propiedades favoreciendo los resultados al regenerar un tejido, de igual manera es importante que presenten propiedades mecánicas de acuerdo para lo que están diseñadas entre estas pruebas destacan el módulo elástico y la resiliencia. En el caso del tejido óseo se debe de tomar en cuenta que se deben mantener sus propiedades mecánicas mientras se forma el tejido nuevo (17).

En el caso del hueso trabecular humano comúnmente soporta un esfuerzo de 5 MPa y un módulo de 50 MPa, lo que se sugiere es que un andamio diseñado para regeneración ósea tenga propiedades mecánicas similares y no que sea

demasiado resistente, ya que puede provocar un esfuerzo al hueso natural remanente y resultar en una erosión ósea (17).

Las pruebas mecánicas realizadas a los andamios de PLA mostraron que los andamios al 7% tienen un módulo elástico mayor en comparación con los andamios al 10%, haciendo a los segundos más resistentes a la tensión, estas propiedades son convenientes al momento de realizar tratamientos que requieran un material con más flexibilidad o bien que sea menos flexible dependiendo de la situación clínica.

Teniendo esta información es posible decidir que concentración de polímero es benéfica dependiendo del tamaño, forma y posición anatómica del tratamiento que se realice.

Por otro lado los resultados *in vivo* demostraron que los andamios a los 100 días después de haber sido injertados no muestran signos de degradación, lo que concuerda con los estudios de Lu y col. (2000) donde colocaron andamios de polímeros similares como PLGA proporción 50:50 y 85:15 y demostraron que el rango de degradación en las muestras donde el componente principal fue PLA, al colocarlo en la zona mesentérica reportaron que la degradación es lenta, encontrando únicamente tejido fibrovascular después de 42 días, nuestros resultados concuerdan con los de Lu y col. (2000) ya que en los cortes histológicos de los 40 días se encontró tejido conectivo denso, sin embargo en nuestras muestras si hay evidencias de degradación (33).

Por otro lado los resultados *in vivo* demostraron que los andamios al estar en contacto con el tejido celular subcutáneo se degradaron a partir de los 60 días.

Principalmente en el grupo de PLA al 10% se observaron células gigantes de cuerpo extraño, esto puede ser debido a que normalmente, el PLA se degrada *in vivo* por medio de una reacción hidrolítica siendo sus metabolitos naturales (no tóxicos), los cuales se eliminan del cuerpo a través de la excreción de orina y por

vía respiratoria. Sin embargo, se ha reportado que aunque sus productos de degradación no son tóxicos, son de naturaleza ácida, causando una disminución en el pH local, que auto catalíticamente acelera la tasa de degradación del polímero y provoca una respuesta inflamatoria más intensa (35).

El PLA al 10% al tener mayor contenido de polímero, la biodegradación de las nanofibras da lugar a una acumulación en el microambiente tisular de los productos ácidos parciales. Sin embargo, nuestro estudio está en concordancia con diferentes informes que han mostrado que después de la implantación de PLA hay una respuesta inflamatoria leve, consecuencia de la degradación de la fase polimérica considerando a este polímero como biocompatible (36,37).

Además, investigaciones recientes indican que la velocidad de biodegradabilidad de los polímeros sintéticos con el tiempo depende principalmente tanto de las propiedades intrínsecas del polímero, incluyendo la estructura química, la presencia de enlaces hidrolíticamente inestables, la relación cristalino-amorfo, el peso molecular inicial y la influencia de factores físicos como la porosidad total, la distribución del tamaño del poro, el diámetro de la fibra y factores químicos; como de la presencia de enzimas y el pH en el lugar de implantación (38,39).



## 9. Conclusiones

Con los datos obtenidos de las pruebas *in vitro* e *in vivo* realizadas durante 100 días a los andamios de PLA en concentraciones de 7% y 10%, se concluye lo siguiente:

- Las soluciones empleadas (solución de Ringer y agua bidestilada) no modificaron significativamente el peso de los andamios, independientemente de las concentraciones de polímero (7 y 10%).
- Los resultados de pH mostraron cambios significativos, en la solución de Ringer y en el agua bidestilada, ya que ambas tuvieron la tendencia hacia la neutralidad, lo que indica que los andamios de PLA independientemente de la concentración de polímero hacen que se modifique el pH de ácido a neutro, de igual manera de básico a neutro.

Con los resultados de las pruebas mecánicas se puede concluir:

- El módulo elástico de los andamios de PLA al 7% es mayor, en comparación con los andamios de PLA al 10%, lo que indica que los andamios del 7% son más rígidos y por lo tanto menos resistentes a la tensión.
- Los registros de las nanofibras de PLA al 7% indican un menor diámetro promedio que las de 10%, por lo que la concentración del polímero afecta el diámetro, de igual manera se observa que después de 100 días las fibras se reducen ligeramente dependiendo de la concentración del polímero, así como del medio en el que se encuentre (agua bidestilada y solución de Ringer).

Con los resultados de las pruebas *in vivo* se concluyó:

- Las pruebas *in vivo* indican que los andamios poliméricos de PLA tanto del 7% como del 10%, después de 100 días no mostraron signos microscópicos de degradación del andamio.
- Sin embargo, se concluye que son biocompatibles en base a que la respuesta inflamatoria inicialmente fue débil y fue disminuyendo con el tiempo, de igual manera las células gigantes de cuerpo extraño fueron disminuyendo, a los cien días ya no hay evidencia de dicha respuesta. En los bordes del defecto solo hay presencia de tejido fibroso denso en ambas concentraciones de PLA.
- Finalmente los andamios de PLA al 7% y 10 % fabricados mediante la técnica de AJS muestran propiedades fisicoquímicas y mecánicas favorables además de considerarse biocompatibles.
- Se sugiere realizar con ellos terapias traslacionales con animales para evaluar el potencial en la regeneración tisular.

## 10. Referencias bibliográficas

1. Tverdokhlebov SI, Bolbasov EN, Shesterikov E V., Antonova L V., Golovkin AS, Matveeva VG, et al. Modification of polylactic acid surface using RF plasma discharge with sputter deposition of a hydroxyapatite target for increased biocompatibility. *Appl Surf Sci. Elsevier B.V.*; 2015;329:32–9.
2. Siqueira L, Passador FR, Costa MM, Lobo AO, Sousa E. Influence of the addition of  $\beta$ -TCP on the morphology, thermal properties and cell viability of poly ( lactic acid ) fi bers obtained by electrospinning. *Mater Sci Eng C. Elsevier B.V.*; 2015;52:135–43.
3. Liang T, Mahalingam S, Edirisinghe M. Creating “hotels” for cells by electrospinning honeycomb-like polymeric structures. *Mater Sci Eng C. Elsevier B.V.*; 2013;33(7):4384–91.
4. Braghirolli DI, Steffens D, Pranke P. Electrospinning for regenerative medicine: A review of the main topics. *Drug Discovery Today*. 2014.
5. Presas AMF. Boletín UNAM-DGCS-476 [Internet]. 2016. Available from: [http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2016\\_476.html](http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2016_476.html)
6. Dr. Raúl Rosales-Ibáñez, Biol. Keila Neri Alvarado-Estrada MCFO-G. Ingeniería Tisular en Odontología. *Rev ADM*. 2012;VOL. LXIX:164–7.
7. Newman Michael G., Carranza Fermín A., Takei Henry H. Periodontología Clínica de Carranza. 11th ed. Amolca; 2014. 283-285 p.
8. Lindhe J, Lang NP, Karring T. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Editorial Medica Panamericana;
9. García Echeverría J. Periodoncia e Implantología. Océano/Ergon; 2011.
10. Soto Góngora S, Taxis González MG. Injertos óseos: Una alternativa efectiva y actual para la reconstrucción del complejo cráneo-facial. *Rev Cubana Estomatol*. 1995, Editorial Ciencias médicas; 2005;42(1):0–0.
11. Rosenberg MM. Periodontal and prosthetic management for advanced cases. Quintessence; 1988 [cited 2017 Apr 19].
12. German D, Falke F, Atala A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular Actualización. 2000;98(2).

13. Boland ED. Nanofiber technology : Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;(February 2016).
14. Mano J., Silva G., Azevedo H., Malafaya P., Sousa R., Silva S., et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J R Soc Interface.* 2007;4(17).
15. Ma Z, Kotaki M, Inai R, Ramakrishna S. Potential of Nanofiber Matrix as Tissue-Engineering Scaffolds. *Tissue Eng [Internet].* 2005 Jan [cited 2017 Jan 25];11(1–2):101–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738665>
16. Gomes ME, Reis RL. Tissue engineering: key elements and some trends. *Macromol Biosci [Internet].* 2004 Aug 9 [cited 2016 Nov 8];4(8):737–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15468268>
17. B.L. Seal, T.C. Otero, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Mater Sci Eng.* 2001;34(4–5):147–230.
18. THE AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. *J Periodontol First Ed [Internet].* 1977 [cited 2017 Apr 19];48(57). Available from: <https://www.perio.org/sites/default/files/files/PDFs/ClinicalResources/GlossaryOfPeriodontalTerms2001Edition.pdf>
19. Hardwick R, Hayes BK, Flynn C. Devices for dentoalveolar regeneration: an up-to-date literature review. *J Periodontol.* 1995 Jun [cited 2016 Nov 8];66(6):495–505.
20. Chen FM, Zhang J, Zhang M, An Y, Chen F, Wu ZF. A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials.* Elsevier Ltd; 2010;31(31):7892–927.
21. Chen VJ, Ma PX. Nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds with interconnected spherical macropores. *Biomaterials.* 2004 May [cited 2017 Jan 25];25(11):2065–73.
22. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *Int J Polym Sci.* Hindawi Publishing Corporation; 2011 [cited 2016 Nov 8];2011:1–19.

23. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(18):3413–31.
24. Liao SS, Cui FZ. In vitro and in vivo degradation of mineralized collagen-based composite scaffold: nanohydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). *Tissue Eng*. 2004;10(1–2):73–80.
25. Smith I, Liu XH, Smith L, Ma P. Nano-structured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology*. 2009;1(1):226–36.
26. Langer R, Vacanti JP, Series N, May N. *Tissue Engineering*. 2008;260(5110):920–6.
27. Altamirano Valencia AA, Vargas Becerril N, Vázquez Vázquez F. Biocompatibility of Nanofibrous Scaffolds with Different Concentrations of PLA/Hydroxyapatite. *Odovtos - Int J Dent Sci*. 2016;18(3):39–50.
28. Xiao L, Wang B, Yang G, Gauthier M. Poly (lactic acid)-based biomaterials: synthesis, modification and applications. *Biomedical Science, Engineering and Technology*. 2012.
29. Abdal-Hay A, Barakat NAM, Lim JK. Novel Technique for Polymeric Nanofibers Preparation: Air Jet Spinning. *Sci Adv Mater*. 2012;4(12):1268–75.
30. Felfel RM, Poocha L, Gimeno-Fabra M, Milde T, Hildebrand G, Ahmed I, et al. In vitro degradation and mechanical properties of PLA- PCL copolymer unit cell scaffolds generated by two-photon polymerization. *Biomed Mater* [Internet]. 2016;11(1):15011. Available from: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-6041/11/1/015011>
31. Ochoa L. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Nom-062-Zoo*. 1999;1–58.
32. Sung H-J, Meredith C, Johnson C, Galis ZS. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials*. 2004;25(26):5735–42.

33. Lu L, Peter SJ, D. Lyman M, Lai HL, Leite SM, Tamada JA, et al. In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials*. 2000;21(18):1837–45.
34. Granados M V. Adhesión y proliferación de las células troncales mesenquimales de médula ósea en andamios fibrilares de poli (ácido L-láctico) (PLA). 2017;38(1):288–96.
35. Gomes ME, Reis RL. Biodegradable polymers and composites in biomedical applications: from catgut to tissue engineering. *Int Mater Rev*. 2004;495(April):261–73.
36. Taylor P, Danoux CB, Barbieri D, Yuan H, Bruijn JD De, Van CA, et al. regeneration In vitro and in vivo bioactivity assessment of a polylactic acid / hydroxyapatite composite for bone regeneration. *Biomatter* [Internet]. 2014;4(November 2014):37–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24441389>
37. Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*. 1996;17(2):93–102.
38. Domingos M, Chiellini F, Cometa S, De Giglio E, Grillo-Fernandes E, Bártolo P, et al. Evaluation of in vitro degradation of PCL scaffolds fabricated via BioExtrusion. Part 1: Influence of the degradation environment. *Virtual Phys Prototyp* [Internet]. 2010;5(2):65–73. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17452751003769440>
39. Muerza-Cascante ML, Haylock D, Hutmacher DW, Dalton PD. Melt Electrospinning and Its Technologization in Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2015;21(2):187–202. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2014.0347>

## 11. Anexos

### (A) Tablas de registro de pruebas *in vitro*

Tabla 3. Registro de pruebas <i>in vitro</i> PLA 10%							
Experimental PLA 10%							
Día	Fecha	Peso en g			pH		
1		1	2	3	1	2	3
20		1	2	3	1	2	3
40		1	2	3	1	2	3
60		1	2	3	1	2	3
80		1	2	3	1	2	3
100		1	2	3	1	2	3

**Tabla 4.** Registro de pruebas *in vitro* PLA 7%

Experimental PLA 7%							
Día	Fecha	Peso en g			pH		
1		1	2	3	1	2	3
20		1	2	3	1	2	3
40		1	2	3	1	2	3
60		1	2	3	1	2	3
80		1	2	3	1	2	3
100		1	2	3	1	2	3



**(B) Tabla de resultados (evaluación de peso *in vitro*)**

<b>Tabla 6. Resultados de peso (g) de muestras <i>in vitro</i></b>								
<b>Peso en g andamios PLA</b>								
<b>Periodo</b>	<b>Experimental 7%</b>		<b>Experimental 10%</b>		<b>Control 7%</b>		<b>Control 10%</b>	
<b>Días</b>	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
0	0.0073	0.0030	0.0029	0.001	0.0045	0.0021	0.0029	0.0079
20	0.0081	0.0020	0.0040	0.004	0.0050	0.0018	0.0025	0.0010
40	0.0080	0.0023	0.0055	0.003	0.0056	0.0011	0.0022	0.0002
60	0.0080	0.0021	0.0028	0.001	0.0056	0.0012	0.0027	0.0008
100	0.0078	0.0022	0.0029	0.001	0.0057	0.0011	0.0030	0.0008

( $\bar{X}$ ): Promedio  
( $\sigma$ ): Desviación estándar

**(C) Tabla de resultados (evaluación de pH *in vitro*)**

<b>Tabla 7. Resultados de pH de muestras <i>in vitro</i></b>								
<b>pH andamios PLA</b>								
<b>Periodo</b>	<b>Experimental 7%</b>		<b>Experimental 10%</b>		<b>Control 7%</b>		<b>Control 10%</b>	
<b>Días</b>	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$	$\bar{X}$	$\sigma$
0	6.36	0	6.36	0	8.16	0	8.16	0
20	6.75	0.12	6.79	0.13	7.26	0.14	7.92	0.38
40	7.27	0.03	7.33	0.03	7.09	0.09	7.65	0.87
60	7.24	0.22	7.05	0.20	7.02	0.002	7.36	0.66
80	7.38	0.22	7.35	0.14	6.95	0.05	7.21	0.69
100	7.49	0.28	7.10	0.11	6.98	0.14	7.74	0.82

( $\bar{X}$ ): Promedio  
( $\sigma$ ): Desviación estándar

**(D) Tabla de registro de pruebas mecánicas**

Tabla 5. Registro de pruebas mecánicas						
No. De Muestra	% PLA	Espesor (mm)	Distancia de Mordaza (mm)	Esfuerzo Máximo (MPa)	Módulo Elástico (MPa)	Carga (KN)

**(E) Tabla de resultados (pruebas mecánicas)**

<b>Tabla 8. Resultados de pruebas mecánicas.</b>							
	Tiempo	$(\bar{X})$ Espesor mm	$(\sigma)$ Espesor mm	$(\bar{X})$ Módulo (MPa)	$(\sigma)$ Módulo (MPa)	$(\bar{X})$ Resiliencia mJ/mm <sup>3</sup>	$(\sigma)$ Resiliencia mJ/mm <sup>3</sup>
<b>10% C</b>	0 Días	0.0579	0.0138	47.1913	80.29	0.05788	0.114
	20 Días	0.0828	0.0252	21.8642	4.52	0.04092	0.022
	40 Días	0.09	0.035	23.385	16.56	0.004625	0.005
	60 Días	0.068	0.012	33.14	18.84	0.01611	0.028
	80 Días	.0804	0.021	16.2356	11.82	0.061514	0.047
	100 Días	0.0736	0.010	23.0502	4.177	0.0311	0.010
<b>7% C</b>	0 Días	0.1885	0.0133	78.7618	20.60	0.03542	0.017
	20 Días	0.1376	0.032	62.3928	21.85	0.01748	0.007
	40 Días	0.1712	0.037	42.857	30.22	0.037616	0.052
	60 Días	0.21	0.035	58.0174	24.30	0.017546	0.004
	80 Días	0.1976	0.016	85.823	14.60	0.02841	0.019
	100 Días	0.197	0.008	27.2016	9.022	0.02486	0.012
<b>10% E</b>	0 Días	0.0579	0.0138	47.1913	80.29	0.05788	0.114
	20 Días	0.0888	0.014	24.9824	6.878	0.02918	0.005
	40 Días	0.0726	0.016	18.5842	11.12	0.016476	0.012
	60 Días	0.083	0.003	35.8772	11.42	0.003018	0.001
	80 Días	0.0676	0.011	14.505	12.31	0.007198	0.004
	100 Días	0.0576	0.010	20.7606	10.70	0.020922	0.010
<b>7% E</b>	0 Días	0.1885	0.0133	78.7618	20.60	0.03542	0.017
	20 Días	0.1484	0.043	68.3848	21.92	0.016204	0.006
	40 Días	0.126	0.0434	73.2074	39.98	0.0049922	0.0062
	60 Días	0.1556	0.045	57.7526	22.56	0.014318	0.0111
	80 Días	0.1906	0.0102	64.9262	29.68	0.03092	0.014
	100 Días	0.0666	0.0100	63.22878	15.50	0.020776	0.010

**(E):** Experimental  
**(C):** Control  
**( $\bar{X}$ ):** Promedio  
**( $\sigma$ ):** Desviación estándar  
**(mm):** Milímetro  
**(MPa):** Megapascal  
**(mJ):** Milijoule  
**(mm<sup>3</sup>):** Milímetro cúbico

**(F) Tabla de resultados (estructura superficial)**

<b>Tabla 9. Resultados del grosor de fibras hiladas de PLA</b>											
<b>7% Inicial</b>		<b>7% E Final</b>		<b>7% C Final</b>		<b>10% Inicial</b>		<b>10% E Final</b>		<b>10% C Final</b>	
<b>Ø en µm</b>	<b>no. de fibras</b>	<b>Ø en µm</b>	<b>no. de fibras</b>	<b>Ø en µm</b>	<b>no. de fibras</b>	<b>Ø en µm</b>	<b>no. de fibras</b>	<b>Ø en µm</b>	<b>no. de fibras</b>	<b>Ø en µm</b>	<b>no. de fibras</b>
0.9-1	0	0.9-1	0	0.9-1	0	0.9-1	0	0.9-1	0	0.9-1	0
0.8-0.89	3	0.8-0.89	11	0.8-0.89	3	0.8-0.89	7	0.8-0.89	8	0.8-0.89	8
0.7-0.79	9	0.7-0.79	2	0.7-0.79	6	0.7-0.79	10	0.7-0.79	9	0.7-0.79	10
0.6-0.69	8	0.6-0.69	10	0.6-0.69	8	0.6-0.69	9	0.6-0.69	10	0.6-0.69	10
0.5-0.59	11	0.5-0.59	13	0.5-0.59	9	0.5-0.59	12	0.5-0.59	8	0.5-0.59	10
0.4-0.49	8	0.4-0.49	11	0.4-0.49	15	0.4-0.49	10	0.4-0.49	10	0.4-0.49	5
0.3-0.39	10	0.3-0.39	8	0.3-0.39	12	0.3-0.39	1	0.3-0.39	0	0.3-0.39	2
0.2-0.29	2	0.2-0.29	4	0.2-0.29	8	0.2-0.29	0	0.2-0.29	0	0.2-0.29	0
0.1-0.19	0	0.1-0.19	0	0.1-0.19	2	0.1-0.19	0	0.1-0.19	0	0.1-0.19	0
0-0.09	0	0-0.09	0	0-0.09	0	0-0.09	0	0-0.09	0	0-0.09	0

**(E):** Experimental  
**(C):** Control  
**(Ø):** Diámetro  
**(µm):** Micrómetro

