



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE  
ANDAMIOS MICROFIBRILARES DE POLIÁCIDO  
LÁCTICO E HIDROXIAPATÍTA.

**BORRADOR DE TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**CIRUJANA DENTISTA**

P R E S E N T A:

KARLA FERNANDA ROSAS ROSALES

TUTOR: Dr. EDUARDO VILLARREAL RAMÍREZ

ASESOR: Mtro. OSMAR CHANES CUEVAS



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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**

A mi segundo hogar, la facultad de odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por recibirme con las puertas abiertas y permitir formarme académicamente.

A todos los doctores que me dieron clases en la facultad y en la clínica periférica Padierna, porque confiaron en mí, y dieron su máximo esfuerzo para que yo me quedara con un poco de cada uno.

A mi asesor de tesis, Osmar Chanes Cuevas por compartir sus conocimientos conmigo, por brindarme su amistad, su paciencia, y su apoyo incondicional.

A mi tutor de tesis, Eduardo Villarreal Ramírez por abrirme las puertas del laboratorio de Bioingeniería de tejidos, y por guiarme durante el proceso de esta tesis.

A los proyectos PAPIIT/UNAM: IA207218, IT100719 y al programa de Becas para Proyectos de Investigación para la UNAM 2018-2019, por el apoyo brindado para llevar a cabo este trabajo.

A DIOS, por darme la fortaleza, la paciencia, la perseverancia, el amor y la salud necesaria para llegar hasta aquí.

A mi madre, Nancy Gabriela Rosales Hernández por haberme guiado por el buen camino, por convertirme en una mujer independiente, y por estar presente en cada etapa de mi vida.

A mi padre, Rubén Carlos Rosas Gómez, por siempre creer en mí, por impulsarme a cumplir mis sueños, por hacerme sentir segura y por aportar un poco de su sabiduría a mi vida.

A mi hermano, Carlos Alejandro Rosas Rosales por siempre estar cuando más lo necesite, porque sin su ayuda, hubiera sido imposible llegar hasta donde estoy.

A mi hermana menor, Regina Michelle Mora Rosales por llegar a alegrar mi vida, por ser mi incentivo, y mi mejor amiga.

A mi cómplice universitario, Gerardo Fuentes Pérez, por cuidar siempre de mí, por levantarme cuando hizo falta, por estar a mi lado en las buenas y en las malas, porque con cada locura hizo que la universidad fuera más divertida.

## **DEDICATORIA**

Con amor, a mis padres.

Que con esfuerzo, paciencia y cariño me dieron lo necesario para concluir esta bella etapa de mi vida.

## RESUMEN

La bioingeniería de tejidos es un área de la ciencia dedicada a estudiar y diseñar materiales sintéticos y/u orgánicos para reparar y estimular la regeneración de los tejidos. Actualmente, la regeneración ósea ha tenido un gran auge, debido al desarrollo de nuevos materiales con propiedades similares a la matriz extracelular. Sin embargo, aún se encuentran varios desafíos por superar, como los altos costos, rechazo inmunitario, riesgo de transmisión de enfermedades, entre otras. En este proyecto se llevó a cabo la síntesis y caracterización de un andamios de ácido poliláctico (PLA) al 10% mediante la técnica de hilado por propulsión de gas (AJS, por sus siglas en inglés), y 2 andamios compuestos formados de ácido poliláctico al 10% adicionados con nanopartículas de hidroxiapatita sintética (nHA) al 0.1% y 0.5%.

El objetivo de la presente tesis es diseñar andamios microfibrilares compuestos de PLA-HA para aumentar la actividad celular, en comparación a los andamios de PLA. Se realizó una caracterización de los andamios sintetizados mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier, y microscopía electrónica de barrido, para evaluar y comparar estadísticamente los 3 andamios. Además se realizaron pruebas biológicas de adhesión y proliferación celular, así como pruebas mecánicas.

En la serie de resultados de los ensayos de tensión y módulo de Young, los resultados sugieren que el andamio compuesto (PLA 10% + 0.1% nHA) presenta las mejores propiedades mecánicas. A partir de nuestros resultados de los ensayos de adhesión y proliferación celular, se demostró que los andamios compuestos favorecieron la adhesión y proliferación celular, siendo el andamio con mayor efecto sobre las células el andamio compuesto PLA 10% + 0.5% nHA.

Como perspectivas a futuro se sugiere evaluar el comportamiento de los andamios compuestos realizando estudios *in vivo*.

## ABSTRACT

Tissue bioengineering is an area of science dedicated to studying and designing synthetic and / or organic materials to repair and stimulate the regeneration of tissues. Currently, bone regeneration has had a great boom, due to the development of new materials with properties similar to the extracellular matrix. However, there are still several challenges to overcome, such as high costs, immune rejection, risk of disease transmission, among others. In this project, the synthesis and characterization of a 10% polylactic acid scaffold (PLA) using the gas propulsion spinning technique (AJS) and 2 compound scaffolds formed of polylactic acid were carried out. to 10% added with synthetic hydroxyapatite nanoparticles (nHA) at 0.1% and 0.5%. The objective of this thesis is to design microfibrillar scaffolds composed of PLA-HA to increase cellular activity, in comparison to PLA scaffolds. A characterization of the scaffolds synthesized by infrared spectroscopy by Fourier transform, and scanning electron microscopy, was performed to statistically evaluate and compare the 3 scaffolds. In addition, biological tests of adhesion and cell proliferation were carried out, as well as mechanical tests. In the series of results of the tests of tension and Young's modulus, the results suggest that the composite scaffold (PLA 10% + 0.1% nHA) presents the best mechanical properties. From our results of adhesion and cell proliferation tests, it was demonstrated that composite scaffolds favored cell adhesion and proliferation, the scaffolding having the greatest effect on cells being the scaffolding compound PLA 10% + 0.5% nHA. As future perspectives, it is suggested to evaluate the behavior of composite scaffolds by conducting in vivo studies.

## TABLA DE ABREVIATURAS

<b>PLA</b>	<b>Poliácido Láctico</b>
<b>nHA</b>	Nanopartículas de hidroxiapatita sintética
<b>AJS</b>	Hilado por propulsión de aire
<b>FTIR</b>	Espectroscopía infrarrojo por transformación de Fourier
<b>MEB</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>FPDH</b>	Fibroblastos de pulpa dental de humano
<b>HA</b>	Hidroxiapatita
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>MTT</b>	Ensayo de azul triazol
<b>ELISA</b>	Análisis de inmunoabsorción unida a enzimas
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>μL</b>	Microlitros
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
<b>CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES</b>	
1.1 GENERALIDADES DEL TEJIDO ÓSEO.....	3
1.1.2 PROPIEDADES MECÁNICAS DEL TEJIDO ÓSEO.....	5
1.2 POLÍMEROS BIODEGRADABLES.....	6
1.2.1 POLIÁCIDO LÁCTICO.....	6
1.3 BIOINGENIERÍA DE TEJIDOS.....	7
1.3.1 ANDAMIOS.....	8
1.4 HILADO POR PROPULSIÓN DE GAS.....	9
<b>CAPÍTULO 2. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	
2.1 JUSTIFICACIÓN.....	11
2.2 OBJETIVOS GENERALES.....	11
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2.4 HIPÓTESIS VERDADERA.....	12
2.5 HIPÓTESIS NULA.....	12
<b>CAPÍTULO 3. MATERIALES Y METODOLOGÍA</b>	
3.1 SÍNTESIS DE ANDAMIOS MICROFIBRILARES.....	13
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS MICROFIBRILARES.....	14
3.2.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	14
3.2.2 MICROSCOPIA ÓPTICA.....	15
3.2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	15
3.2.4 MEDICIÓN DEL DIÁMETRO FIBRILAR.....	16
3.2.5 PRUEBAS MECÁNICAS.....	16
3.3 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.....	17
3.3.1 ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR.....	17
3.3.2 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....	28
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS</b>	
4.1 ANÁLISIS DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMACIÓN DE FOURIER.....	19
4.2 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA.....	24
4.3 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	26
4.4 ENSAYO DE TENSIÓN.....	30
4.5 MÓDULO DE YOUNG.....	31
4.6 ADHESIÓN CELULAR.....	32
4.7 PROLIFERACIÓN CELULAR.....	34
<b>CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41







# INTRODUCCIÓN

Las anomalías en el funcionamiento de los órganos y tejidos a causa de una lesión, enfermedad o envejecimiento tienen un impacto importante en la calidad de vida de las personas, y esto conlleva un importante costo social y económico[1]. Actualmente, existen distintos tratamientos para la recuperación de los órganos y tejidos, aunque las terapias actuales tienen distintas limitaciones[2]. Frecuentemente, el trasplante de órganos es la terapia indicada en diversos casos clínicos, sin embargo, se presentan desventajas como: el uso injertos autólogos y alogénicos, escasez de órganos donantes, el riesgo de transmisión de enfermedades y el rechazo inmunitario[3].

La bioingeniería de tejidos es una nueva y prometedora área de la ciencia que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias biológicas para diseñar y crear sustitutos biológicos que reparen, mantengan o mejoren las funciones de los órganos y tejidos[4]. La bioingeniería de tejidos es un área que debe de entenderse desde distintos enfoques de la ciencia como, a nivel molecular, genético, en la biología del desarrollo, ingeniería de órganos y biomateriales[3]. La bioingeniería de tejidos utiliza tres herramientas básicas para resolver sus problemas: células, biomateriales y biomoléculas[2]. La bioingeniería de tejidos ha sido ampliamente usada en los últimos años, el origen de esta disciplina puede rastrearse hasta el campo de los biomateriales, que es el estudio de materiales usados en el cuerpo humano y sus efectos en el mismo y en los alrededores del biomaterial usado[1]. Mediante éstas herramientas se pretende usar materiales bioactivos, diseñados para interactuar con el cuerpo humano para estimular la reparación del tejido[1].

La técnica de hilado por propulsión de gas (AJS, por sus siglas en inglés) surge como una tecnología efectiva y versátil capaz de producir andamios formados de microfibras, capaces de biomimetizar a las proteínas de la matriz extracelular, y por lo tanto favorecer la proliferación celular[5,6]. Los andamios de polímeros biodegradables han mostrado funcionar para reconstrucción de matrices de tejidos y órganos[7]. Múltiples reportes

han demostrado que las propiedades del Políácido Láctico (PLA), tienen un gran potencial en múltiples aplicaciones debido a su capacidad para modificar sus propiedades[8]. Esto aunado al hecho de su comprobada capacidad de degradación en sistemas biológicos y su compatibilidad, convierten al PLA en un polímero adecuado para aplicaciones médicas[8, 9].

Los tejidos mineralizados como hueso, esmalte, dentina y cemento radicular durante su desarrollo comparten similitudes fundamentales en su formación[3,10]. Los tejidos mineralizados están compuestos por una fase mineral denominada hidroxiapatita (HA) la cual está en un porcentaje de alrededor de 70% a 90% dependiendo el tejido y por una fase orgánica compuesta principalmente por colágena tipo I (90%) y proteínas no colagénicas (10%); así como distintos iones dopantes de la fase mineral dependiendo el tejido mineralizado al cual se haga referencia[11,12]. El uso de materiales de fosfatos de calcio para reparación ósea, ha ganado territorio en el área de la odontología y la medicina[13]. El uso de cerámicas de fosfatos de calcio para el reemplazamiento óseo o implantes dentales, ha tenido un auge en la ortopedia y la odontología en los últimos años debido a su éxito en múltiples casos clínicos[14] y a sus propiedades de osteoconducción y biocompatibilidad. La hidroxiapatita,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , tiene distintas aplicaciones en la odontología, como relleno en defectos periodontales, aumento de reborde alveolar, conservación de alveolos post extracción, recubrimiento de implantes metálicos o en reconstrucción maxilofacial[15]. Sin embargo, se ha observado que la HA presente en los seres vivos tiene dimensiones nanocristalinas, entre 20nm y 80nm de largo por 2nm y 5nm de ancho[16], mientras que la HA comercial generalmente presenta dimensiones micrométricas. En estudios recientes se ha observado que la HA en dimensiones nanométricas tiene una mayor bioreabsorbilidad y presenta mejores propiedades mecánicas, al ser comparadas con sus contrapartes micrométricas[17].

## **1. ANTECEDENTES.**

### **1.1 Generalidades del tejido óseo.**

El tejido óseo constituye aproximadamente el 18% del peso corporal, y desempeña 6 funciones básicas: sostén, protección, asistencia en el movimiento, homeostasis mineral, producción de células sanguíneas, y almacenamiento de triglicéridos[18]. El tejido óseo es catalogado como un “material compuesto” conformado de un 60% de materia inorgánica o también llamada mineral, la cual está constituida principalmente por cristales de hidroxapatita, de igual manera también contiene iones como el magnesio, flúor, potasio y sulfato. El otro 30% lo constituye la materia orgánica formada principalmente por colágena tipo I, y en menor medida colágena tipo V y VII, además de proteínas no colagénicas como: proteoglicanos, glucoproteínas, factores de crecimiento y citosinas. El 10% restante lo ocupa el agua[18,19].

La matriz extracelular cuenta con características biológicas que proporcionan a las células un soporte mecánico para la adhesión celular y la activación de vías de señalización, así pues interviene también en el crecimiento, la proliferación y el comportamiento celular[19]. Por otra parte el tejido óseo también es constituido por células, las cuales se describen a continuación:

1.- Células osteogénicas: Células troncales no especializadas que derivan del mesénquima, éstas realizan división celular y las células resultantes se transforman en osteoblastos[18].

2.- Osteoblastos: Son células formadoras de hueso que sintetizan y secretan fibras colágenas y otros componentes orgánicos necesarios para construir la matriz osteoide, quedando atrapados en sus secreciones y convirtiéndose en osteocitos[18].

3.- Osteocitos: Estas células son osteoblastos maduros y son las células principales del hueso, mantienen su metabolismo diario a través del intercambio de nutrientes y productos metabólicos con la sangre[18].

4.- Osteoclastos: Son células derivadas de la fusión de monocitos, con la capacidad de liberar poderosas enzimas lisosómicas y ácidos que destruyen la matriz osteoide[18].

El tejido óseo se clasifica de acuerdo a su densidad, en compacto si su matriz extracelular es de gran densidad, y en esponjoso si su matriz extracelular es de baja densidad. Ambos tipos se encuentran unidos y no presentan un límite bien definido que separe a un tipo de otro[20]. El tejido óseo compacto lo encontramos principalmente en las paredes corticales del hueso alveolar, sus componentes se organizan en osteonas o sistemas haversianos que consisten en un conducto central o de Havers con laminillas concéntricas, lagunas, osteocitos y canalículos[18]. Por otra parte, el tejido óseo esponjoso, se encuentra de manera predominante en los espacios interradiculares e interdentes dentro del hueso alveolar, no contiene osteonas, y sus componentes se organizan en láminas dispuestas en una red irregular de columnas delgadas que se denominan trabéculas[21]. Los espacios macroscópicos entre las trabéculas hacen más livianos a los huesos[18], ambos tipos de hueso poseen un revestimiento interno llamado endostio y uno externo llamado periostio, compuesto de tejido conjuntivo rico en células osteogénicas y una amplia red de vasos que tienen como principal función la nutrición del tejido óseo y el suministro de células para su crecimiento y regeneración[21].

El tejido óseo es una bioestructura activa, que se encuentra permanentemente en un complejo proceso de remodelación[22], en el cual intervienen factores hormonales y otros factores como la presión sobre las membranas celulares, que activan o inhiben la formación y/o reabsorción del tejido. Este proceso se lleva a cabo mediante el acoplamiento de células óseas (osteoclastos y osteoblastos), sobre una misma superficie. Cada ciclo de remodelado consta de seis fases: activación, reabsorción, inversión, formación, mineralización y adaptación [23].

## 1.2 Propiedades mecánicas del tejido óseo

Para entender con mayor claridad el comportamiento mecánico del hueso, se requiere de la biomecánica, una disciplina que permite el estudio del hueso como estructura y los efectos que en éste se producen cuando se presentan cargas y reacciones debido al movimiento[24]. Las propiedades mecánicas del tejido óseo varían de acuerdo a la densidad del tejido. El tejido óseo compacto (de alta densidad) contiene poca cantidad de poros, entre 0.05% y 0.1%, es el componente más sólido del tejido óseo y constituye el 80% del esqueleto humano[23]. El tejido óseo esponjoso soporta mayor esfuerzo, pero menos deformación antes del colapso y contiene mayor cantidad de poros entre 0.75% y 0.95%, es el principal componente de las epífisis de los huesos largos y de su área interna[23].

El tejido óseo esponjoso puede soportar hasta un 50% de deformación antes de empezar a deformarse, mientras que el hueso cortical cede y se fractura cuando la deformación excede el límite convencional de fluencia ( $\sigma_0$ ) [25]. Sin embargo, la estructura cambia en el curso del tiempo debido a que los elementos microestructurales como las osteonas y las fibras de colágeno interactúan constantemente de una forma coordinada para cumplir con las necesidades del hueso (remodelación autónoma y continua). Los cristales de hidroxiapatita cuentan con un módulo elástico bastante elevado, con un valor de 114 GPa, mientras que el módulo de Young del eje de la molécula de colágeno es de 1.41 GPa[26].

El tejido óseo es considerado un material ortotrópico, es decir, su resistencia mecánica dependerá de la dirección en la cual se le aplique la carga (flexión, compresión o tracción). Por ello, no es posible cuantificar específicamente la resistencia o las propiedades elásticas del tejido óseo con un valor absoluto[27]. El tejido óseo posee una resistencia a la tensión parecida la del hierro, éste es tres veces más ligero y diez veces más flexible, por ello, el tejido óseo compacto tiene mejores propiedades para

resistir la flexión, la torsión y el cizallamiento. Mientras, el tejido óseo esponjoso está diseñado para resistir las fuerzas de compresión[23].

## **1.2 POLÍMEROS BIODEGRADABLES**

Existen dos tipos de polímeros biodegradables clasificados en base a su origen, los polímeros naturales y los sintéticos.

Los polímeros naturales incluyen:

- Polisacáridos como el almidón, alginato, quitina / quitosano, y derivados del ácido hialurónico.
- Proteínas como la colágena, geles de fibrina, y soja de seda[27].

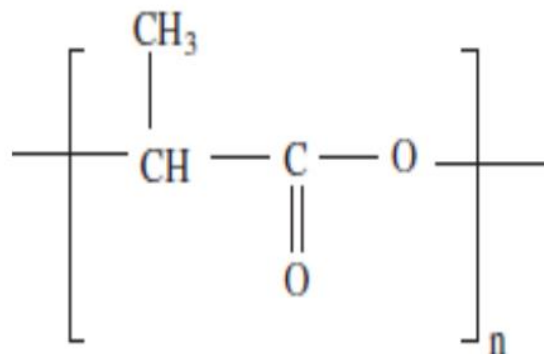
Los polímeros sintéticos tienen la ventaja de poder ser sintetizados bajo ciertas condiciones y, por lo tanto, exhiben ciertas propiedades físicas y mecánicas predecibles y reproducibles, como lo son la resistencia a la tracción, el módulo de Young y la velocidad de degradación. Otra ventaja es el control de pureza en el material, disminuir las posibles desventajas como la toxicidad, el rechazo por parte del sistema inmune y la presencia de infecciones, al utilizar polímeros sintéticos puros [28].

### **1.2.1 POLIÁCIDO LÁCTICO (PLA)**

El PLA es un biopolímero de la familia de los poliésteres alifáticos termoestables, se sintetiza a partir de L y D poliácido láctico, que es producido a partir de la fermentación del azúcar y algunos polisacáridos como el maíz de trigo, almidón y entre otros[29]. El PLA-L y PLA-D son polímeros estereoregulares con uso frecuente en bioingeniería de



tejidos[27]. El PLA es un biopolímero biocompatible, y biodegradable, su temperatura de transición vítrea es de 60 a 65 grados °C y su temperatura de fusión es de aproximadamente 175 grados °C, presenta buena resistencia a la tracción, baja extensión y un alto módulo de Young (4,8GPa) [29]. Sus propiedades químicas permiten la degradación hidrolítica a través de la desesterificación, una vez degradado, los componentes monoméricos se eliminan por vías naturales. El cuerpo humano contiene mecanismos altamente regulados para eliminar por completo los componentes monoméricos del ácido láctico. El PLA se elimina a través del ciclo del ácido tricarbóxico o ciclo de Krebs[28]. Debido a estas propiedades, el PLA es considerado un material adecuado para aplicaciones médicas y es aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA, por sus siglas en inglés)[27].



*Fig.1 Estructura química del PLA [27].*

### **1.3 BIOINGENIERÍA DE TEJIDOS**

La bioingeniería de tejidos es una nueva y prometedora área de la ciencia que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias biológicas para diseñar y crear sustitutos biológicos que reparen, mantengan o mejoren las funciones de los órganos y tejidos[4]. La bioingeniería de tejidos ha tenido gran auge desde principios de la década de 1990

por ser una ciencia con el potencial de desarrollar terapias clínicas para reparar tejidos y órganos[30]. Esta ciencia tiene como objetivo mejorar la reparación y regeneración de tejidos vivos utilizando materiales metálicos, cerámicos, polímeros y de origen biológico, ya sea solos o en combinación[30]. La bioingeniería de tejidos es un área que puede estudiarse desde el nivel molecular, el nivel genético, la biología del desarrollo, la ingeniería de órganos y los biomateriales[3]. La ingeniería de tejidos basada en el desarrollo de andamios se ha convertido en un área con gran potencial al incorporar componentes químicos, físicos y biológicos que puedan dirigir la actividad celular[31].

### **1.3.1. ANDAMIOS**

Un andamio es un biomaterial que está estructurado para permitir el soporte de células, promover su crecimiento, permitir el intercambio de nutrientes y la formación de su matriz extracelular, proporcionando una superficie adecuada para la fijación, la proliferación y la diferenciación celular[29]. La bioingeniería de tejidos basada en andamios se ha convertido en el área con mayor auge, debido a su potencial tecnológico[31].

Las características estructurales de los andamios en bioingeniería de tejidos afectan la respuesta celular y deben ser diseñados para ayudar la adhesión, proliferación y diferenciación celular[32]. Un andamio artificial debe de:

- Mimetizar la estructura y la función biológica de la MEC propia del tejido, tanto como sea posible en términos de señales físicas, como de composición bioquímica[30].
- Proporcionar a las células el espacio suficiente para generar tejido nuevo.

- Soportar cargas mecánicas para que se lleve a cabo la estimulación de las células[27].
- Ser biocompatible, es decir, que el material no debe provocar reacciones inflamatorias y/ tóxicas después de su implantación [29].
- Permitir el paso fluido de células, nutrientes y oxígeno, así como, permitir el paso para eliminar desechos[27].
- Debe tener una vida útil aceptable, y tener la propiedad de ser reabsorbible[29].
- El tiempo de reabsorción del material con el que sea fabricado, debe coincidir con el tiempo que tarda la neoformación del tejido tratado[32].
- Los productos obtenidos de su degradación también deben ser biocompatibles[32].

#### **1.4 HILADO POR PROPULSIÓN DE GAS (AJS)**

La técnica de hilado por propulsión de gas (AJS, por sus siglas en inglés) es un nuevo concepto de interés mundial para aplicaciones en bioingeniería de tejido óseo, ya que permite la síntesis de andamios basados en la micro/nano tecnología [33,29]. El hilado por propulsión de gas, es una técnica alterna de bajo costo para recubrir de forma rápida y conformar grandes áreas sobre una variedad de sustratos[26]. También ésta técnica permite la obtención de andamios nanocompuestos, híbridos, es decir, que cuenten con componentes orgánicos e inorgánicos con una estructura porosa[29]. La técnica AJS no requiere equipos costosos, se basa en el uso de gas inerte (ej.Argón), que se dispara a una alta velocidad para alargar la solución del polímero en fibras delgadas a través de la boquilla de un aerógrafo; en el mismo instante el disolvente comienza a evaporarse y continúa haciéndolo aun después de que las fibras son depositadas sobre un sustrato (ej. Papel encerado)[27,33]. Básicamente la técnica consta de la utilización de:

- Un aerógrafo.
- Un colector.
- Un compresor / tanque de gas.
- Una solución polimérica[29].

Otra característica única de esta técnica es la alta tasa de producción en poco tiempo (5 ml / min). La técnica AJS es una técnica de procesamiento fácil, económico, novedoso, y eficiente[33].

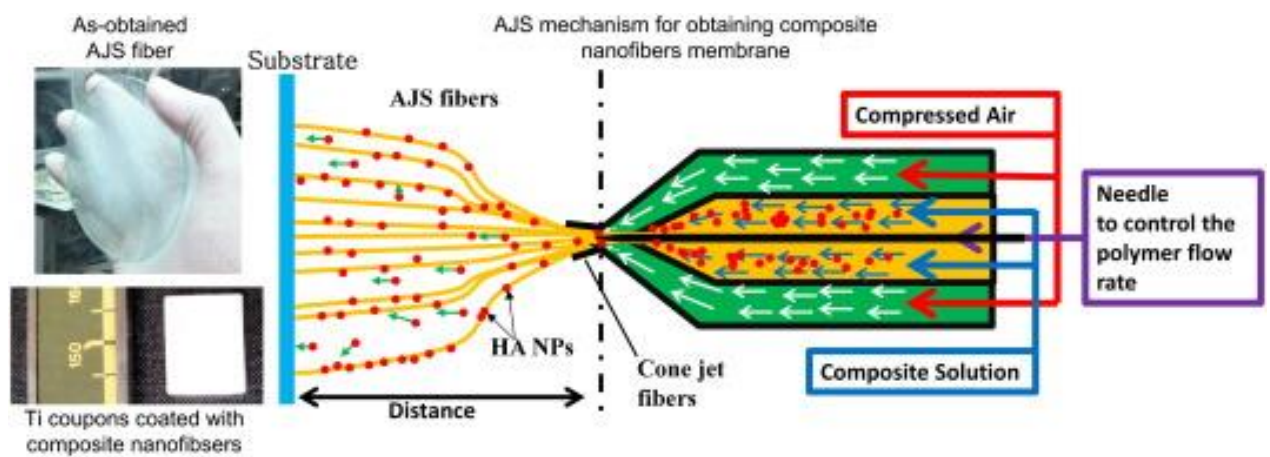


Fig. 2 Mecanismo de acción de la técnica hilado por propulsión de gas (AJS, por sus siglas en inglés) para la síntesis de andamios[33].

## 2. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 2.1 JUSTIFICACIÓN

En años recientes, el desarrollo de la bioingeniería de tejidos ha tenido un avance vertiginoso en el desarrollo de nuevas tecnologías en la regeneración de órganos y tejidos. Los materiales poliméricos, como el PLA, han destacado por sus magníficas propiedades mecánicas y por su biocompatibilidad con el sistema del huésped. La técnica AJS ha demostrado ser una técnica versátil en la formación de microfibras de biopolímeros, logrando mimetizar a las fibras de la matriz extracelular de los tejidos. La hidroxiapatita se considera un material bioactivo, el cual permite una mayor adhesión y proliferación celular. Además, estudios anteriores han demostrado que el uso de nanopartículas de HA incrementa la actividad biológica de las células. Por lo anterior, se considera el desarrollo de microfibras de PLA/nHA promoverán una mayor respuesta biológica en comparación a las microfibras de PLA.

### 2.2 OBJETIVOS GENERALES

- Sintetizar y realizar una caracterización preliminar de andamios microfibrilares de PLA adicionados con nanopartículas de hidroxiapatita sintética (nHA) que permitan una mayor proliferación celular.

## 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar andamios microfibrilares poliméricos de PLA con dos concentraciones distintas de nHA.
- Caracterizar mediante microscopía óptica los andamios microfibrilares PLA/HA.
- Establecer el efecto de nHA en la proliferación celular.

## 2.4 HIPÓTESIS VERDADERA

- Si la nHA permite una mayor actividad biológica a las células, entonces los andamios microfibrilares de PLA/nHA presentarán una mejor respuesta en los fibroblastos de pulpa dental de humano (FPDH), en comparación de los andamios microfibrilares de PLA.

## 2.5 HIPÓTESIS NULA

- Los andamios microfibrilares de PLA/nHA no tendrán ninguna diferencia significativa en comparación al grupo control en los ensayos celulares.



### 3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

#### 3.1 SÍNTESIS DE ANDAMIOS MICROFIBRILARES

Se prepararon 3 soluciones distintas de ácido poliláctico (NatureWorksInc®). La primera de PLA 10% (p/v) al 10%, la segunda de PLA al 10% + 0.1% de nHA (Aldrich®), y la tercera de PLA 10% + 0.5% de nHA. En la tabla 1 se muestran las medidas utilizadas durante la síntesis de andamios.

CLORO-FORMO	ETANOL	PLA	HIDROXIAPATÍTA	DISTANCIA DEL COLECTOR	PRESIÓN
75ml	25ml	10gr	0gr	11 cm	30psi
75mL	25ml	10gr	0.1gr	11 cm	30psi
75mL	25mL	10gr	0.5gr	11cm	30psi

Se preparó una solución de PLA a una concentración del 10%. Para ello se disolvieron 10gr de PLA (NatureWorksInc®) en 75mL de cloroformo y se mantuvo en agitación durante 12 hrs. Posteriormente, el volumen se ajustó con 25mL de etanol y se mantuvo en agitación durante 1 hr. La solución preparada se utilizó para la síntesis de los andamios control.

*Tabla 1. Medidas estandarizadas para la síntesis de andamios microfibrilares (PLA 10%), (PLA 10% + nHA 0.1%), (PLA 10% + nHA 0.5%) mediante la técnica (AJS).*



Se preparó otra solución de PLA al 10% mediante el mismo método para el “grupo experimental 1” y se le adicionaron 0.1gr de nHA, con esta solución se sintetizaron los andamios compuestos PLA 10% /HA 0.1%. Por último, se preparó una tercera solución de PLA al 10% y se le adicionó 0.5gr de nHA para el grupo experimental 2.

Mediante la técnica de hilado por propulsión de gas (AJS, por sus siglas en inglés) se sintetizaron los distintos grupos de andamios, se usó un aerógrafo (ToolCraft®) con una boquilla de 0.3mm de diámetro, a una presión constante de 30psi con una compresora de aire (Sprayit®). Los andamios fueron depositados sobre placas de papel encerado a una distancia de 11cm y se depositó durante 15min.

Una vez sintetizados los distintos grupos de andamios, fueron almacenados para su posterior uso.

## 3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS MICROFIBRILARES

### 3.2.1 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

Los grupos funcionales presentes en los andamios se caracterizaron mediante el uso de la técnica de espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). El FTIR se realizó con un espectrofotómetro Perkin Elmer GladiATR® de reflectancia total atenuada, el cual permite realizar las mediciones sin preparación adicional, las muestras fueron analizadas con 32 barridos en el infrarrojo medio ( $400-4000\text{cm}^{-1}$ ).

### 3.2.2 Microscopía óptica

Para la observación inicial de los distintos grupos de andamios se utilizó un microscopio óptico (AmScope®). Donde se observaron 8 muestras cuadradas (5x5mm), de cada grupo a un aumento de 20X, con lo cual se obtuvieron las primeras imágenes del estudio.

### 3.2.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para continuar con el análisis de la morfología de las fibras a una mayor resolución, se procedió a observarlas mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB). En los andamios PLA 10% (grupo control), PLA 10% + nHA 0.1% (grupo experimental 1) y PLA 10% + nHA 0.5% (grupo experimental 2), se observó la distribución de las nHA depositadas sobre las fibras de PLA en el caso de los andamios compuestos, se comparó la similitud entre los 3 grupos de andamios. Se recortaron 3 muestras de cada grupo en forma cuadrada 5x5mm, fueron colocadas sobre cinta carbón con doble cara adhesiva, posteriormente fueron llevadas a un equipo de Ion Sputtering, donde se realizó un recubrimiento de Au durante 4min. El recubrimiento de una capa fina de Au (oro) tiene el propósito de aumentar la conductividad de las muestras durante su observación en el microscopio electrónico de barrido (JOEL JMS 7600F®).

### 3.2.4 Medición del diámetro fibrilar

Con la finalidad de obtener los diámetros de las fibras depositadas en los distintos grupos control, experimental 1 y experimental 2, se obtuvieron 3 micrografías digitales mediante (MEB) de cada grupo de andamio, las cuales fueron insertadas en el software “Image J”, para medir 150 fibras en cada micrografía, reportando un promedio e histograma de cada grupo de estudio.

### 3.2.5 PRUEBAS MECÁNICAS

Para evaluar la resistencia a la tensión y el módulo de Young de los diferentes grupos control, experimental 1 y experimental 2, se cortaron 10 probetas de ensayo con un molde que conserva las medidas especificadas en la norma ASTM-D1708 para cada grupo. Se obtuvieron un total de 30 probetas, se les midió a cada una el espesor con un micrómetro “Mitutoyo® 293-67N”. Las pruebas mecánicas se realizaron con una máquina universal de pruebas mecánicas (INSTRON®) en condiciones ambientales a una velocidad de prueba de 1mm/min. Posteriormente, se realizaron los procedimientos estadísticos con un ANOVA ( $p < 0.001$ ).

### 3.3 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

#### 3.3.1 ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR

Una vez sintetizados los distintos grupos: control, experimental 1 y experimental 2, se procedió a cortar 12 muestras por cada grupo de estudio en forma de discos (8mm de diámetro). Los discos fueron esterilizados en radiación ultravioleta durante una hora, y se colocaron dentro de una placa de cultivo celular de 48 pozos; a continuación se sembraron fibroblastos de pulpa dental de humano (FPDH) obtenidos de cultivo primario, a una densidad de  $5 \times 10^3$  por pozo y se cultivaron durante 4hrs y 24hrs en una incubadora (New Brunswick®) con una concentración de CO<sup>2</sup> del 5% y a una temperatura de 37°C. A las 4hrs de incubación se realizaron tres lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) para remover las células que no se adhirieron a la superficie de los andamios. Las células adheridas al andamio se fijaron con glutaraldehído al 2% durante 1hr y posteriormente se realizaron 2 lavados con (PBS) para la eliminación del glutaraldehído. A las 24hrs se repitió el mismo proceso. La adherencia celular se evaluó de acuerdo al método de cristal violeta; donde se adicionaron 300µL de cristal violeta al 0.1% en cada pozo durante 30min, posteriormente se realizaron 3 lavados con agua bidestilada para remover el colorante no específico, posteriormente se colocaron 300µL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1% durante 1hr. De la solución obtenida se tomaron 200µL, y se colocaron en un plato lector para su posterior análisis de inmunoabsorción unida a enzima, con un lector ELISA, (Chromate®), a una absorbancia de 560nm. El experimento de adhesión celular fue realizado por triplicado utilizando la prueba estadística ANOVA ( $p < 0.001$ ).

### 3.3.2 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Se evaluó la proliferación celular de fibroblastos de pulpa dental de humano (FPDH) en presencia de los distintos grupos: control, experimental 1 y experimental 2, mediante el ensayo de azul triazol (MTT). La técnica se basa en la habilidad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial para oxidar la sal de tetrazolio. Las células activas convierten el MTT en formazán morado insoluble. El formazán obtenido se solubiliza y su concentración se obtiene mediante densidad óptica. Se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^3$  FPDH obtenidas de cultivo primario en cada grupo de andamio y se incubaron durante 1, 3, 5 y 7 días. Después de cada periodo experimental, las células se incubaron con MTT (5mg/mL) en una incubadora (New Brunswick®) con una concentración de CO<sup>2</sup> del 5% y a una temperatura de 37°C durante 4hrs. Pasado este tiempo, se le adicionaron 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se dejó actuar por 30min, el sobrenadante fue colocado en una placa de 96 pozos y se leyó en un lector ELISA (Chromate®) para obtener la densidad óptica a una longitud de onda de 545nm. Los experimentos se realizaron por triplicado utilizando la prueba estadística ANOVA ( $p < 0.001$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISIS DE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMACIÓN DE FOURIER (FTIR)

Mediante el uso de la FTIR se caracterizaron los grupos funcionales de la nHA (Aldrich®) y los grupos: control, experimental 1 y experimental 2. En la figura 3 se muestran las distintas bandas de absorción para las nHA. Las bandas características de HA son:  $950\text{cm}^{-1}$  y  $1,054\text{cm}^{-1}$  atribuidas al grupo funcional fosfato ( $\text{PO}_4$ )<sup>3-</sup>, una banda de absorción en  $3,584\text{cm}^{-1}$  característica del grupo hidroxilo (OH). En la tabla 2 se presentan las bandas observadas en la figura 3, y el grupo funcional al cual corresponden.

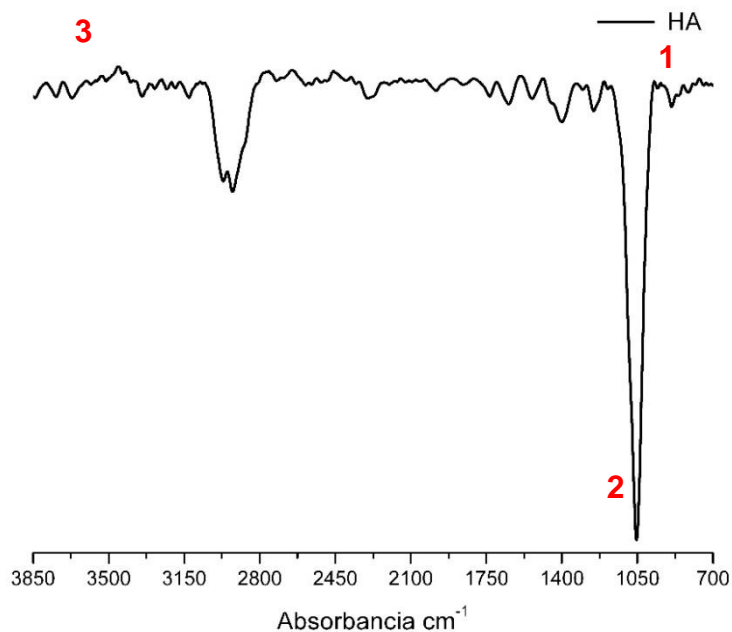


Fig. 3 Espectrograma del polvo de (nHA ) Aldrich ®677418, 200 nm).

<b>FTIR</b>	
<b>BANDAS DE ABSORCIÓN DE nHA</b>	
<b>POSICIÓN</b>	<b>ENLACE</b>
950cm <sup>-1</sup> <b>1</b>	(PO <sub>4</sub> ) <sup>3-</sup> v <sub>1</sub>
1054cm <sup>-1</sup> <b>2</b>	(PO <sub>4</sub> ) <sup>3-</sup> v <sub>3</sub>
3584cm <sup>-1</sup> <b>3</b>	OH <sup>-1</sup> estiramiento

*Tabla 2 bandas de absorción detectadas en el Espectrograma del polvo de nHA (Aldrich ®677418, 200nm), que coinciden con el trabajo descrito por (I. Uysala, F.Severcana,b, Z.Evisa,c,n 2013 et al).*

En la figura 4, se muestran las bandas presentes en el espectro FTIR del grupo control. Las bandas características son: banda en 1,080cm<sup>-1</sup> perteneciente a los enlaces éster (C-O=C), banda de absorción en 1,185cm<sup>-1</sup> causada por el enlace (C-O), banda de absorción característica a 1,752cm<sup>-1</sup> correspondiente al grupo carbonilo (C=O), tres bandas de absorción en el rango de 1,380cm<sup>-1</sup> a 1,455cm<sup>-1</sup> atribuidas a los grupos funcionales (C-H), y (CH<sub>3</sub>). En la tabla 3, se presentan las bandas de absorción observadas en la figura 4 y el grupo funcional con el que se asocian.

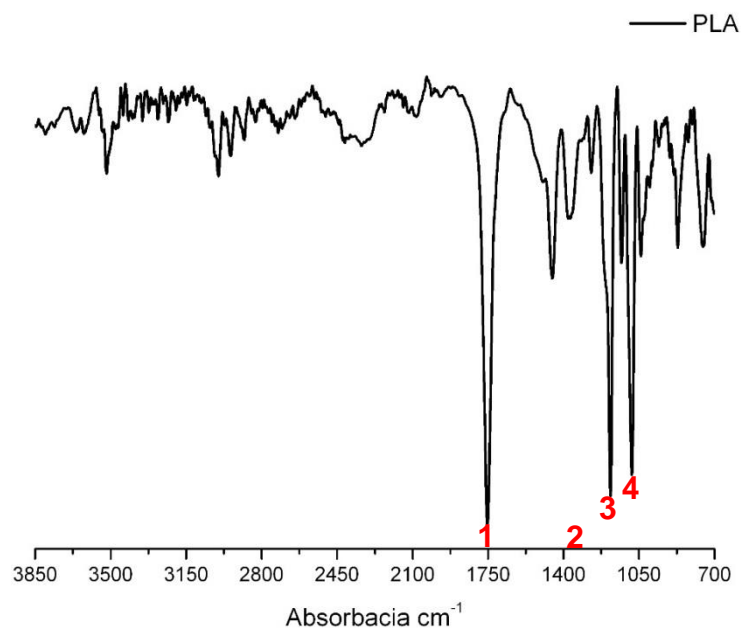


Fig. 4 Espectrograma del andamio control (PLA 10%) sintetizado con (NatureWorksInc®. D2002).

<b>FTIR</b>	
<b>BANDAS DE ABSORCIÓN DE PLA</b>	
<b>POSICIÓN</b>	<b>ENLACE</b>
1,752cm <sup>-1</sup> <b>1</b>	C=O
1,380cm <sup>-1</sup> – 1455cm <sup>-1</sup> <b>2</b>	CH, (CH <sub>3</sub> )
1,185cm <sup>-1</sup> <b>3</b>	C-O
1,080cm <sup>-1</sup> <b>4</b>	C-O=C

Tabla 3. Bandas de absorción detectadas en el Espectrograma del andamio control (PLA 10%) sintetizado con (NatureWorksInc®). que coinciden con el trabajo ya antes descrito por (Granados H, Marco, 2018. et al).



En la figura 5 se muestra el espectrograma correspondiente a los grupos experimentales 1 y 2. En el espectro de ambos grupos experimentales se observan las bandas asociadas al PLA y debido a su intensidad sobreponen a las bandas asociadas a nHA. En la tabla 4 se muestra la asignación de las bandas de absorción para cada grupo experimental.

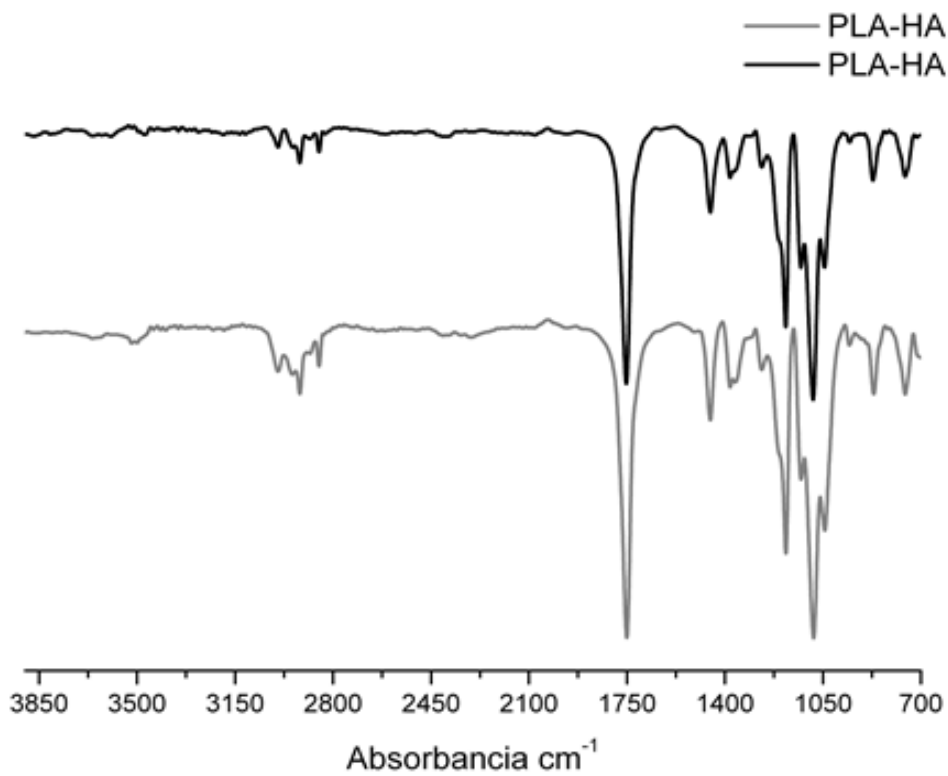


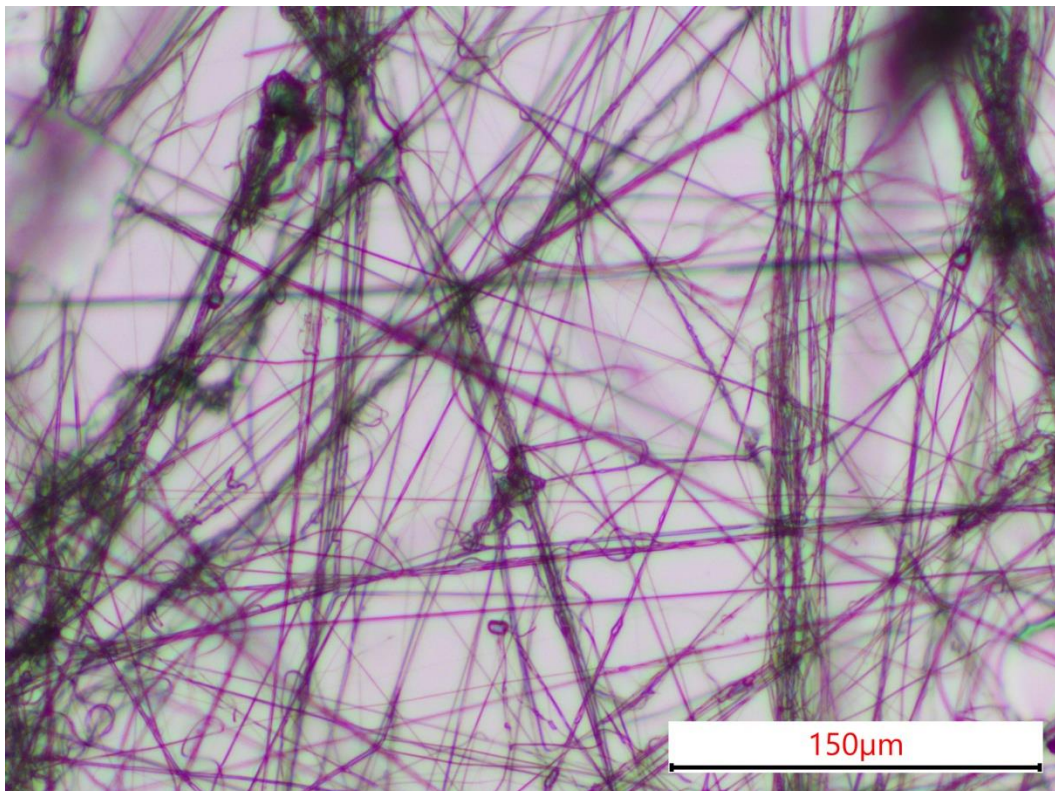
Fig. 5 Espectrograma apilado de los 2 andamios compuestos (PLA 10% + nHA 0.1%) y (PLA 10% + nHA 0.5%).

	PLA	nHA
<b>ANDAMIO</b>	1,080cm <sup>-1</sup> C-O=C <b>1</b>	
<b>PLA 10% + 0.1% nHA</b>	1,183cm <sup>-1</sup> C-O <b>2</b>	875 cm <sup>-1</sup> (PO <sub>4</sub> ) <sup>3-</sup> v <sup>1</sup> <b>6</b>
	1,378cm <sup>-1</sup> CH <b>3</b>	1,043 cm <sup>-1</sup> <b>7</b>
	1,456cm <sup>-1</sup> CH <sub>3</sub> <b>4</b>	
	1,752cm <sup>-1</sup> C=O <b>5</b>	
<b>ANDAMIO</b>	1,080 cm <sup>-1</sup> C-O=C <b>1</b>	
<b>PLA 10% + 0.5% nHA</b>	1,176 cm <sup>-1</sup> C-O <b>2</b>	862 cm <sup>-1</sup> <b>6</b>
	1,383 cm <sup>-1</sup> CH <b>3</b>	1,039 cm <sup>-1</sup> <b>7</b>
	1,454 cm <sup>-1</sup> CH <sub>3</sub> <b>4</b>	
	1,752 cm <sup>-1</sup> C=O <b>5</b>	

Tabla 4. Bandas de absorción detectadas en el espectrograma de los andamios compuestos (PLA 10% + nHA 0.1%) y (PLA 10% + nHA 0.5%), que coinciden con el trabajo ya antes descrito por (Granados H, Marco, 2018 et al), (I. Uysala, F. Severcana, b, Z. Evisa, c, n 2013 et al).

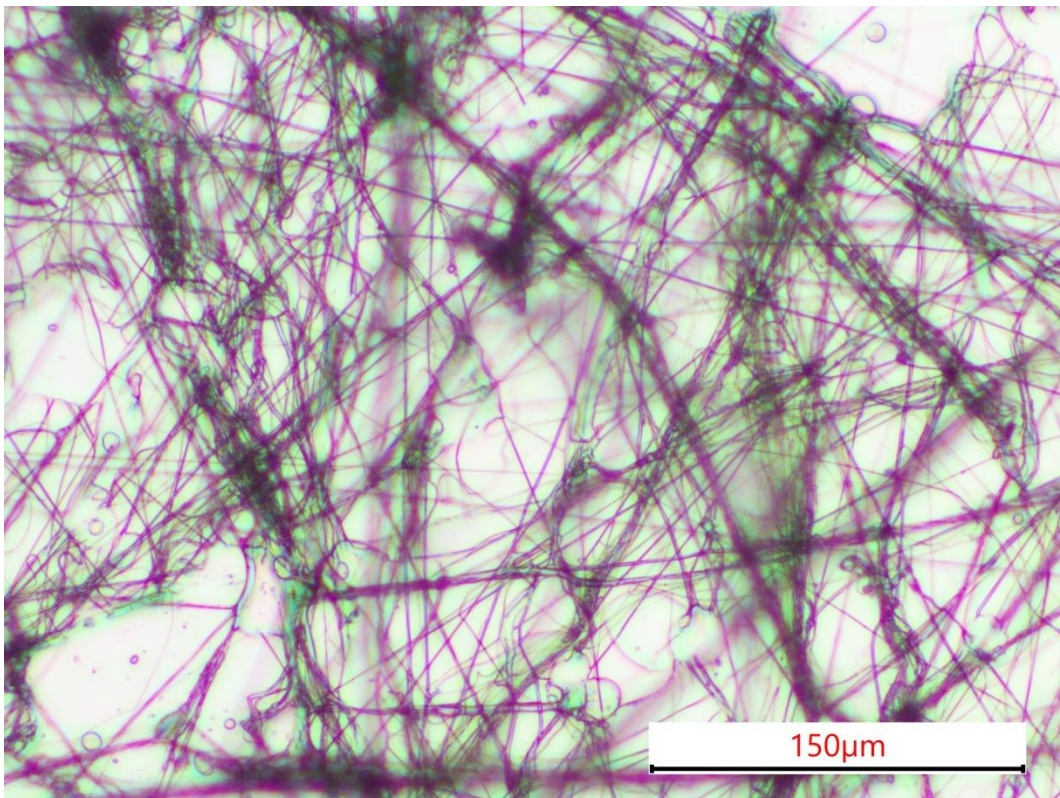
## 4.2 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA.

A través de un microscopio (AmScope®) se obtuvo una serie de imágenes de los distintos grupos. En la figura 6 se muestra una micrografía a 20X del andamio grupo control en la cual se observa una morfología variada de fibras delgadas y continuas sin un orden específico, el tamaño observado de cada fibra es variable, aproximadamente entre  $2\mu\text{m}$  y  $4\mu\text{m}$ . Se observan algunos depósitos con mayor cantidad de fibras a lo largo del andamio, que llegan a parecer una sola fibra gruesa.



*Fig.6 Micrografía óptica del andamio PLA al 10% a 20X de aumento*

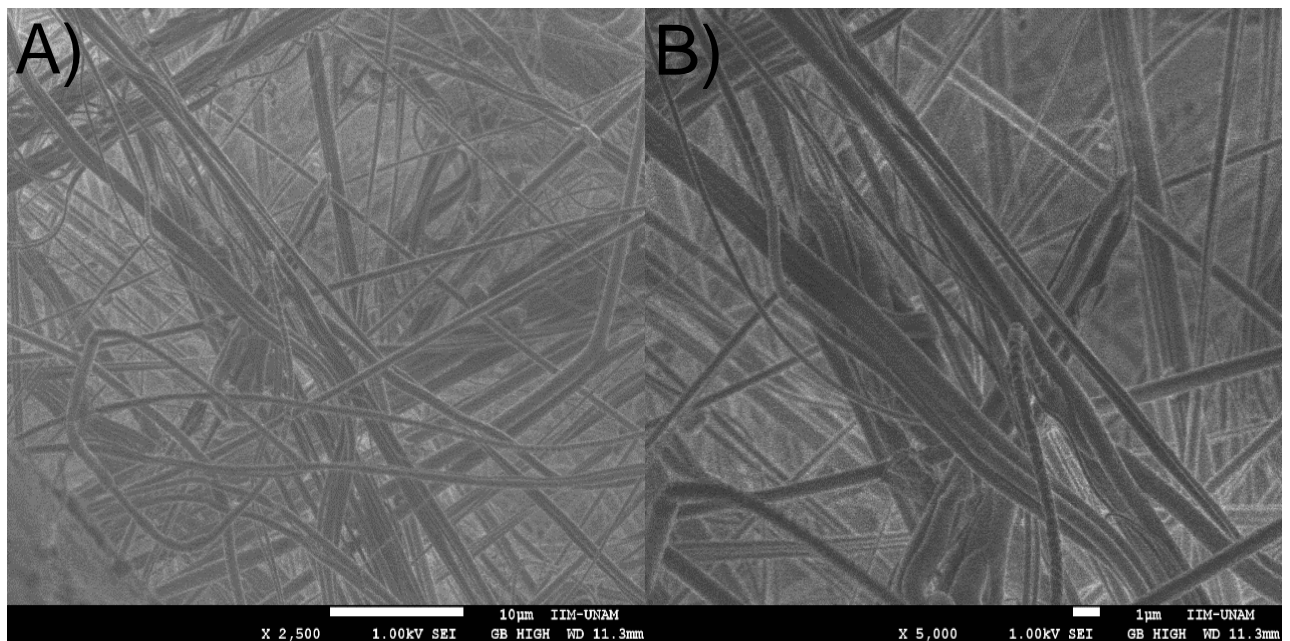
En la figura 7 se presenta una micrografía del grupo experimental 1 a 20X, en la cual se presenta una morfología de fibras continuas dispuestas de forma aleatoria de tamaños variables, aproximadamente entre 3 $\mu$ m y 6 $\mu$ m, las fibras obtenidas son más gruesas en comparación con las fibras del andamio control, así mismo se encontraron depósitos con mayor número de fibras a lo largo del andamio, que dan el aspecto de una sola fibra gruesa.



*Fig.7 Micrografía óptica del andamio PLA al 10% + 0.5gr nHA a 20X de aumento*

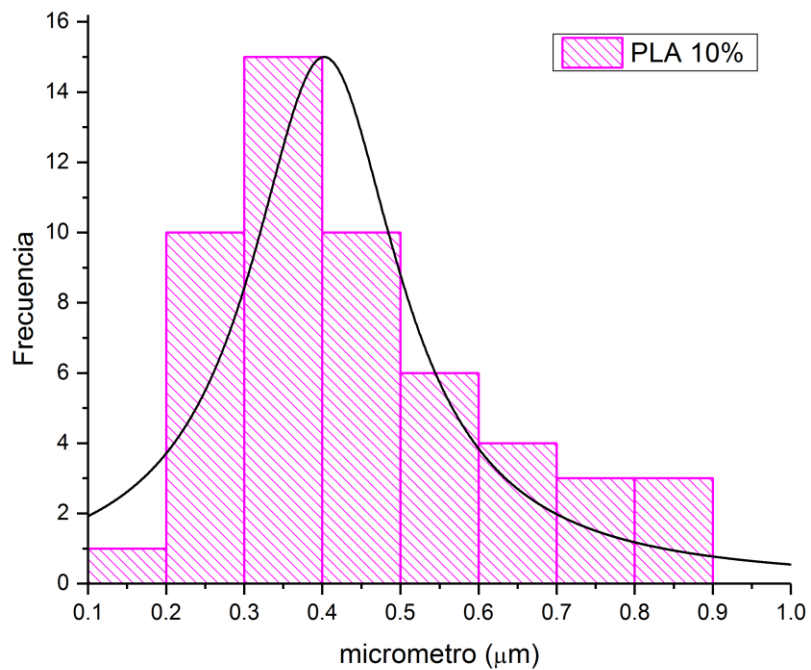
### 4.3 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.

Para evaluar la morfología de los andamios a una mayor resolución, se procedió a observarlos mediante microscopia electrónica de barrido (MEB). Los resultados mostraron que el grupo control PLA 10% presentó una morfología mayoritaria de fibras finas, lisas y continuas, con una media de diámetro de 400nm. De igual manera, observamos que las fibras no mantienen un orden específico, dando lugar a un aspecto de red entrelazada a lo largo de todo el andamio.



*Fig.8 A) MEB del andamio control (PLA 10%) a 2500X B) MEB del andamio control (PLA 10%) a 5000X.*

En la figura 9 se muestra un histograma obtenido a partir de las mediciones realizadas en las micrografías del andamio control, reportando un promedio de espesor fibrilar de 400nm.



*Fig. 9 Histograma obtenido del diámetro fibrilar evaluado en el andamio control (PLA 10%) reportando un promedio de 0.4 $\mu\text{m}$ .*

En otra serie de resultados, encontramos que el grupo experimental 1 (PLA 10% + nHA 0.1%) muestran una morfología de fibras con leves ensanchamientos a lo largo de ellas, con distintos espesores nanométricos, que van de los 200nm a los 700nm, a diferencia de la morfología del grupo control estas fibras son más gruesas.

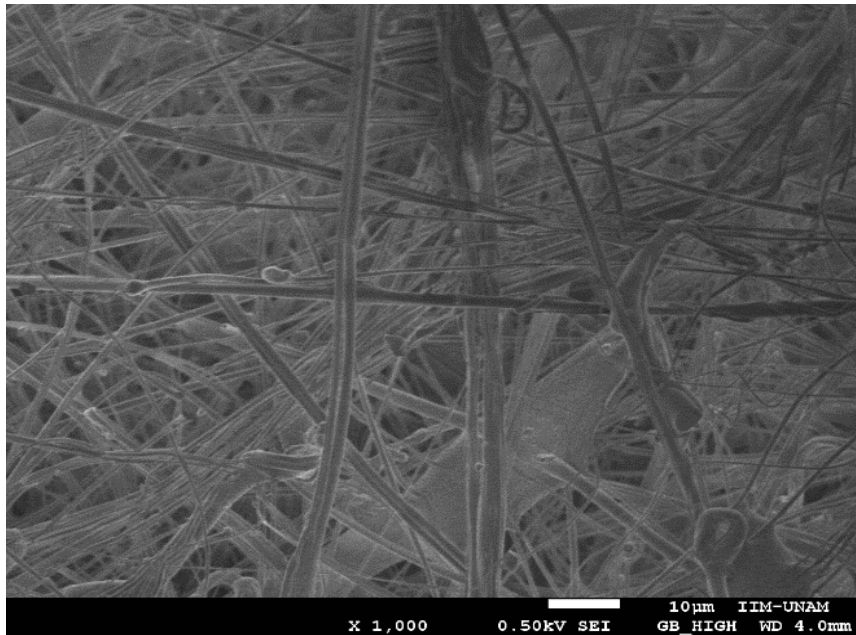


Fig. 10 Micrografía del andamio compuesto PLA 10% + nHA 0.1% a 1000X

En la figura 11 se muestra un histograma obtenido a partir de las mediciones realizadas en las micrografías del grupo experimental 1, reportando un promedio de espesor fibrilar de 450nm.

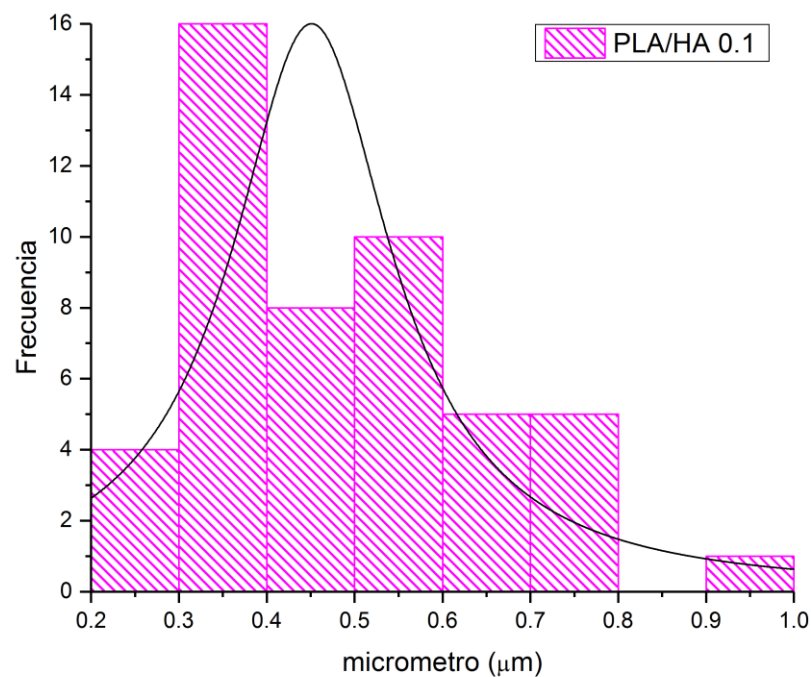
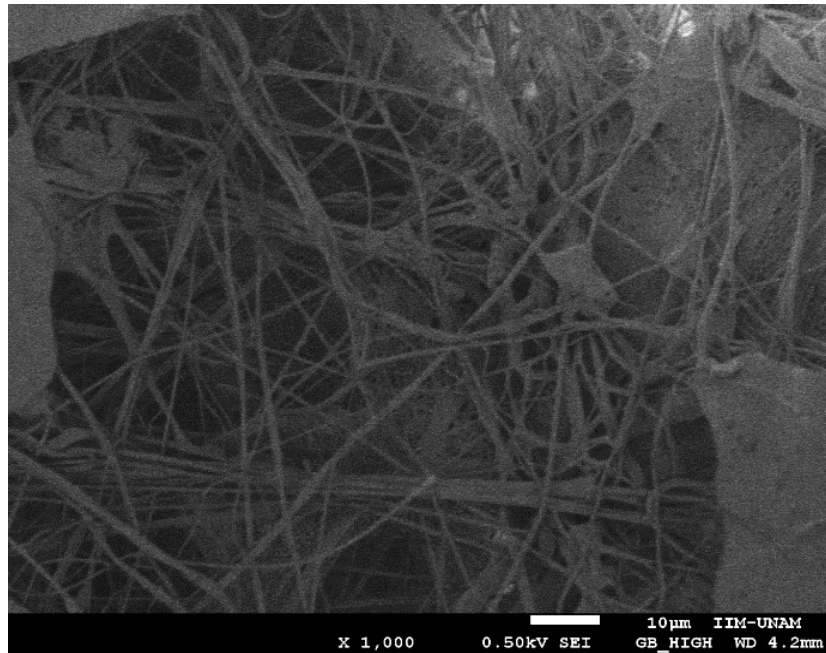


Fig. 11 Histograma obtenido del diámetro fibrilar evaluado en el andamio compuesto (PLA 10% + nHA 0.1%) con una media de 450nm de diámetro.

Por otro lado, en las micrografías obtenidas del grupo experimental 2 (PLA 10% + nHA 0.5%) observamos una morfología en forma de red fibrilar con distintos espesores nanométricos, que a diferencia del andamio compuesto PLA 10% + nHA 0.1%, mostraron un ligero aumento en los ensanchamientos atribuidos a las nHA embebidas en las microfibras de PLA.



*Fig.12 MEB de andamios compuestos.- C) Micrografía a 1000X de (PLA 10% + nHA 0.1%), D) Micrografía a 1000X de (PLA 10% + nHA 0.5%.*

En la figura 13 se muestra un histograma obtenido a partir de las mediciones realizadas en las micrografías del grupo experimental 2, reportando un promedio de espesor fibrilar de 450nm.



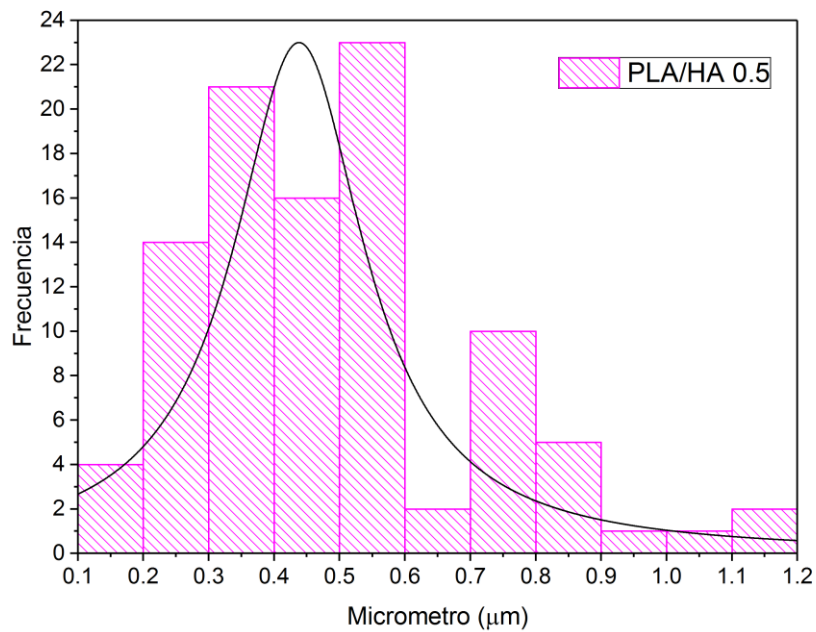


Fig.13 Histograma obtenido del diámetro fibrilar evaluado en el andamio compuesto (PLA 10% + nHA 0.5%), con una media de 450nm de diámetro.

#### 4.4 ENSAYO DE TENSIÓN

Para obtener la resistencia a la tensión en los grupos: control (PLA 10%), experimental 1 (PLA 10%, PLA 10% + nHA 0.1%) y experimental 2(PLA 10% + nHA 0.5%), se realizó un ensayo de tensión. En la figura 14, se muestran los resultados obtenidos. Se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos experimentales al aplicar la prueba estadística ANOVA ( $p < 0.001$ ). El andamio control obtuvo una media de resistencia a la tensión de 3.023 MPa, mientras que el grupo experimental 1 obtuvo una media de resistencia a la tensión de 1.74MPa, así mismo el grupo experimental 2 obtuvo una media de resistencia a la tensión de 1.34MPa. Lo que nos habla de una disminución significativa en el módulo de tensión obtenida en los andamios compuestos al ser comparados con el grupo control ( $p < 0.001$ ).

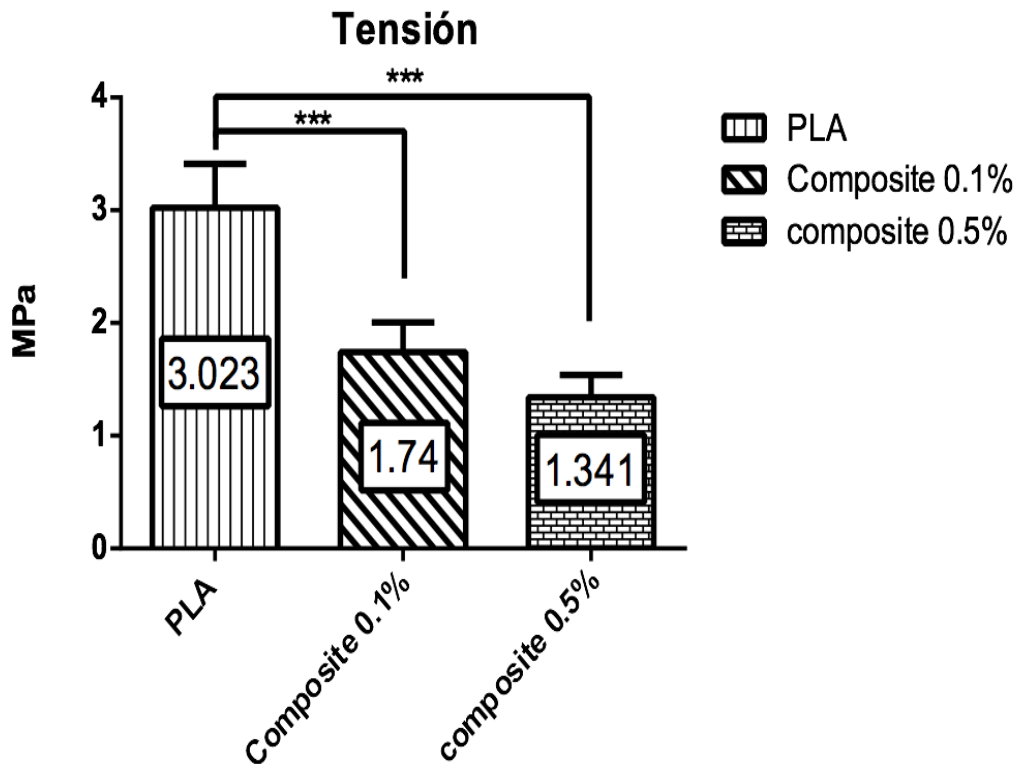


Fig. 14 Resistencia a la tensión de los distintos grupos de andamios (PLA 10%), (PLA 10% + nHA 0.1%) y (PLA 10% + nHA 0.5%), con un ANOVA ( $p < 0.001$ ).

#### 4.5 MÓDULO DE YOUNG

Con la finalidad de demostrar la elasticidad que presentaban los distintos grupos, se midió el módulo de elasticidad. En la figura 15, se observan las diferencias significativas entre el grupo control y los grupos experimentales 1 y 2, al aplicar la prueba estadística ANOVA con una ( $p < 0.001$ ). El grupo control obtuvo un módulo de Young con una media de tensión de 131.48MPa, mientras que el grupo experimental 1 obtuvo un módulo de Young con una media de tensión de 51.33MPa, y el grupo experimental 2 obtuvo una media de tensión de 52.38MPa. Lo que nos habla de una disminución significativa en el

módulo de Young obtenida en los grupos experimentales al ser comparada con el grupo control ( $p < 0.001$ ).

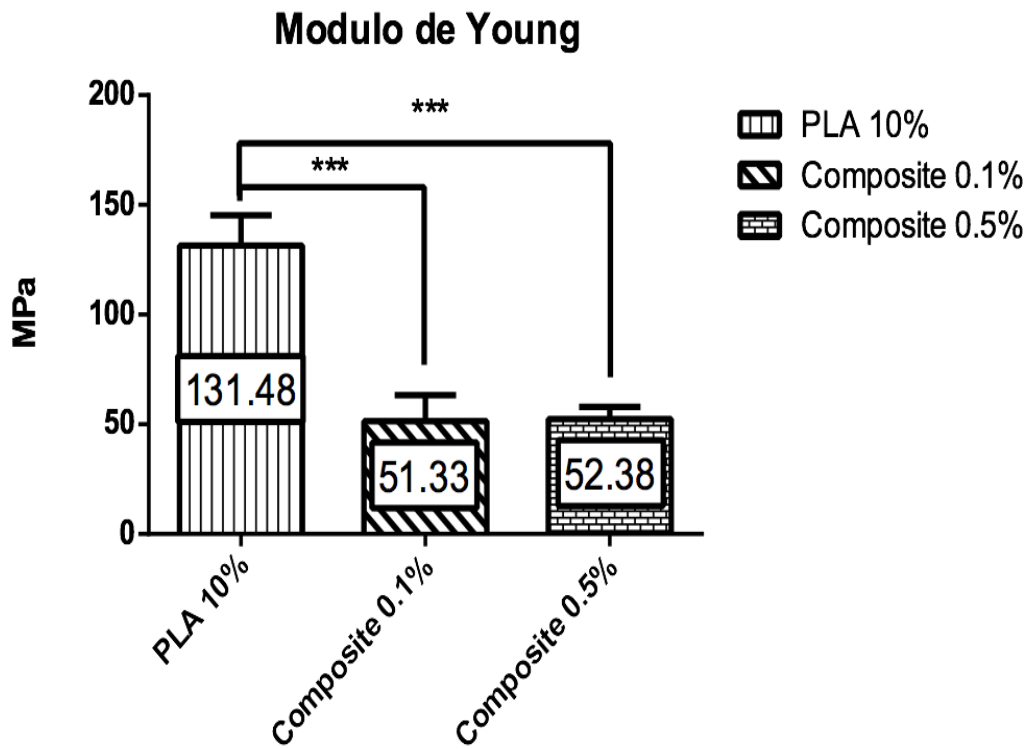
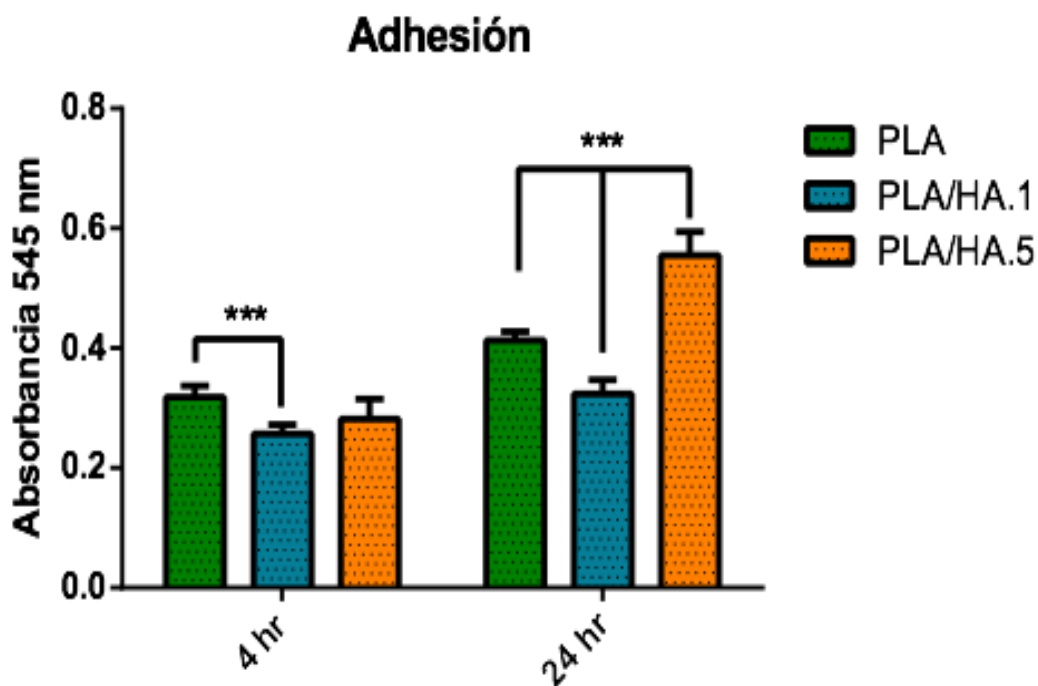


Fig. 15 Módulo de Young de los distintos grupos de andamios (PLA 10%), (PLA 10% + nHA 0.1%) y (PLA 10% + nHA 0.5%), con un ANOVA ( $p < 0.001$ ).

## 4.6 ADHESIÓN CELULAR

Para determinar la adhesión celular a las 4hrs y 24hrs de incubación, se realizó la prueba de absorción con cristal violeta. En la figura 16, se muestra la adherencia obtenida de las células FPDH sobre los 3 distintos grupos. A las 4hrs de incubación celular existió una adhesión celular similar entre los 3 distintos grupos, de acuerdo a la prueba ANOVA

( $p < 0.001$ ). Sin embargo, a las 24hrs se observaron diferencias significativas al comparar el proceso de adhesión obtenido entre los grupos experimentales.



*Fig. 16 Adhesión celular de los distintos grupos de andamios (PLA 10%), (PLA 10% + nHA 0.1%) y (PLA 10% + nHA 0.5%) a las 4 y 24hrs. ANOVA ( $p < 0.001$ ).*

En la figura 18, se observan fotografías de microscopía óptica tomadas durante el ensayo de adhesión celular de los andamios. A las 4hrs no se observan diferencias visibles significativas en la cantidad de FPDH anclados sobre ambos andamios. Sin embargo, a las 24hrs existió un aumento visiblemente significativo en la adhesión celular del grupo experimental 2.

## 4.7 PROLIFERACIÓN CELULAR

Para evaluar el efecto de los andamios en la viabilidad celular de FPDH, se realizó un ensayo de proliferación celular mediante el ensayo de azul triazol (MTT). Los resultados de la figura 17 demostraron que los grupos experimentales 1 y 2, no presentan efectos citotóxicos a las 24hrs y 72hrs de incubación, en relación con el grupo control. Sin embargo, a los 5 y 7 días de incubación, los andamios aumentan la proliferación celular siendo más efectivo el grupo experimental 2. Finalmente, a los 7 días no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

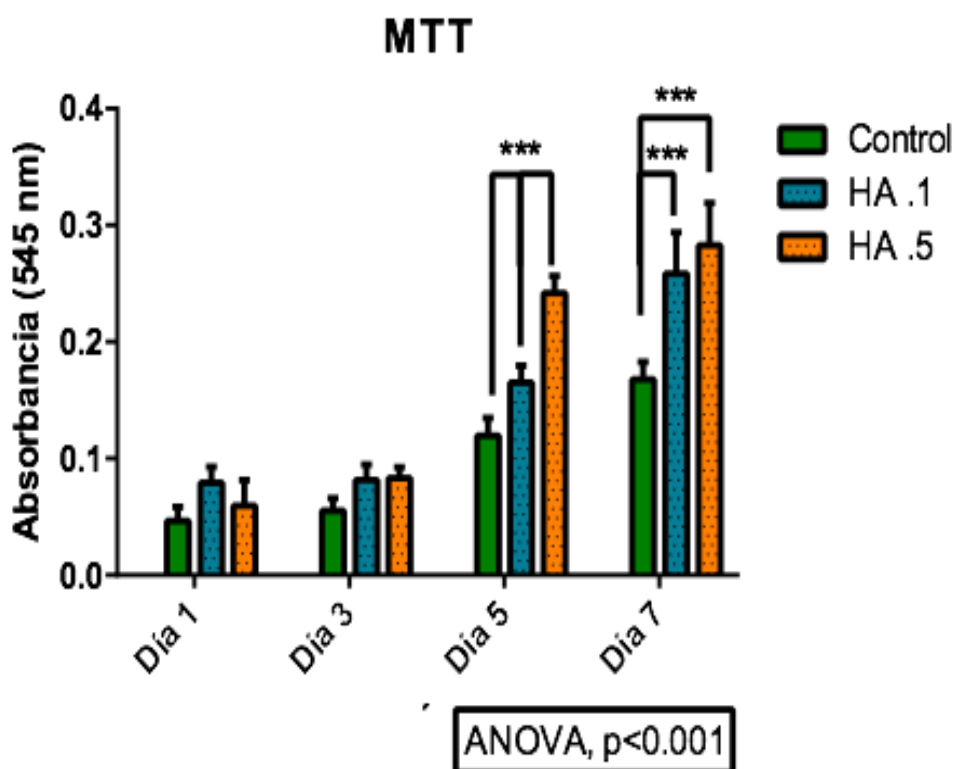
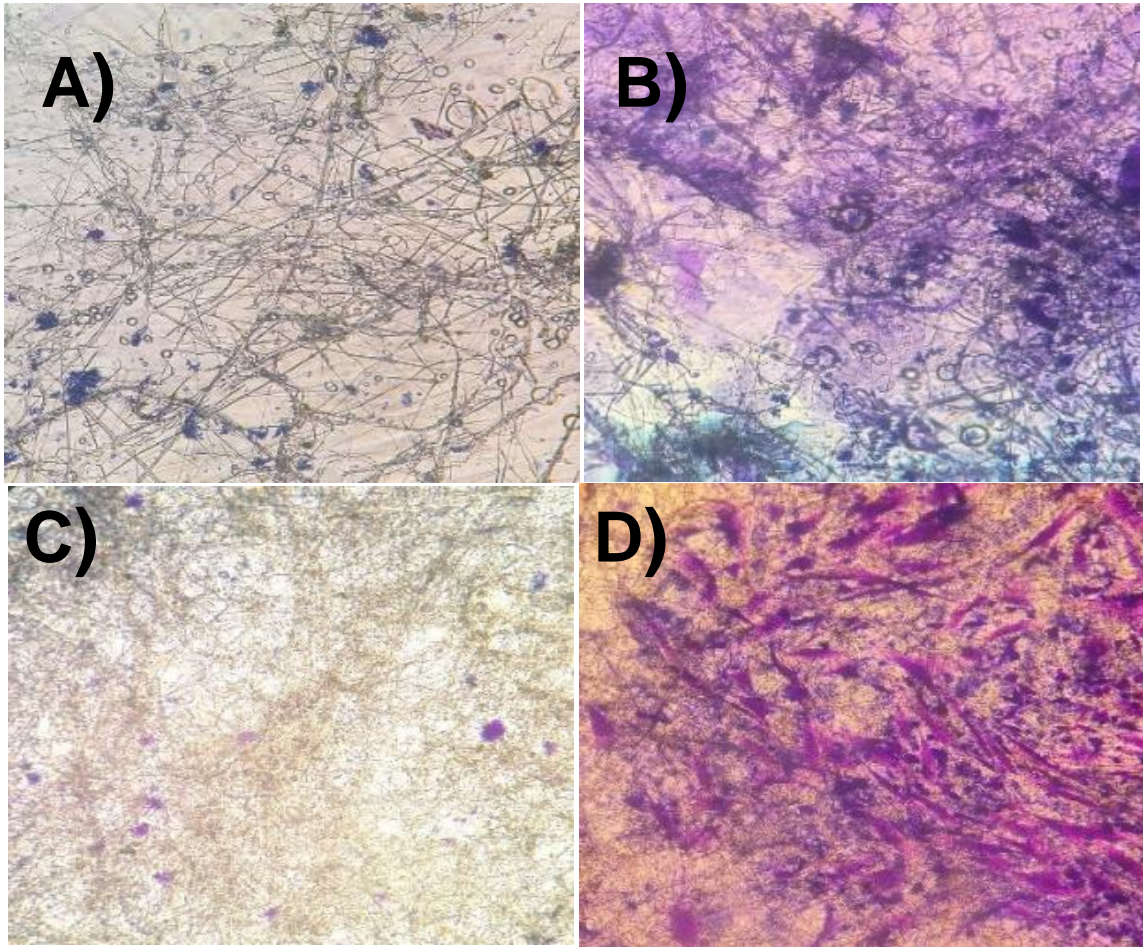


Fig. 17 Viabilidad celular de los distintos grupos de andamios (PLA 10%), (PLA 10% + nHA 0.1%) y (PLA 10% + nHA 0.5%) al día 1, 3, 5 y 7. con un ANOVA ( $p < 0.001$ ).



**Fig. 18** A) Microscopía óptica de la adhesión a 4 horas en cristal violeta del andamio compuesto (PLA 10% + HA 0.1gr) , B) Microscopía óptica de la adhesión a las 24 horas en cristal violeta del andamio compuesto (PLA 10% + HA 0.1gr); C) Microscopía óptica de la adhesión a 4 horas en cristal violeta del andamio compuesto (PLA 10% + HA 0.5gr); D) Microscopía óptica de la adhesión a las 24 horas en cristal violeta del andamio compuesto (PLA 10% + HA 0.5gr).

## 5. DISCUSIÓN

Actualmente, la bioingeniería de tejidos ha puesto gran interés en el diseño y fabricación de andamios que sirvan a las células como soporte físico y permitan la regeneración de los tejidos[35]. Estudiar a los biomateriales de manera individual da la pauta para combinar sus propiedades y crear nuevos biomateriales mejorados e innovadores.

EL ácido poliláctico (PLA) es un biopolímero que posee buenas propiedades mecánicas, y que al hidrolizarse produce ácido láctico, el cual se metaboliza de manera natural, lo que lo hace un biopolímero biocompatible y biodegradable. Sin embargo el PLA por sí solo carece de un potencial bioactivo, es decir que tenga la capacidad de enlazarse a los tejidos vivos y promover la actividad celular[37]. Por otro lado, la hidroxiapatita es una biocerámica bioactiva pues posee una estructura y composición química semejante al tejido óseo[28,39]. Estudios recientes han reportado combinaciones de ácido poliláctico con distintas cerámicas bioactivas, con la finalidad de sinergizar sus propiedades[36,37,38].

En este proyecto se sintetizaron y caracterizaron 3 tipos de andamios: un grupo control (PLA al 10%), y 2 grupos experimentales [grupo experimental 1(PLA 10%+0.1% nHA) y grupo experimental 2(PLA 10% + 0.5% nHA)], todos sintetizados a partir de la técnica de hilado por propulsión de gas.

Por medio del análisis de FTIR se caracterizaron los grupos funcionales presentes en los distintos grupos de andamios sintetizados mediante la técnica AJS. Nuestros resultados de FTIR realizado al grupo control PLA 10% mostraron las bandas de absorción características a  $1,080\text{cm}^{-1}$  a  $1,185\text{cm}^{-1}$  a  $1,752\text{cm}^{-1}$  y tres bandas de absorción ubicadas dentro del rango de  $1,380\text{cm}^{-1}$  a  $1,455\text{cm}^{-1}$ . Dichos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en el trabajo de (Granados H, Marco, 2018. et al). Por lo tanto, el caracterizado demuestra que los grupos funcionales presentes en el

PLA usado para este proyecto, no tienen modificaciones en su estructura química. Por otra parte, en el FTIR realizado a las muestras de nHA se observaron bandas de absorción características a  $950\text{cm}^{-1}$  y  $1,054\text{cm}^{-1}$  atribuidas al grupo funcional fosfato ( $\text{PO}_4$ )<sup>3</sup>, y una banda de absorción en  $3,584\text{cm}^{-1}$  característica del grupo hidroxilo (OH). Esta serie de resultados coincide con los resultados descritos por (I. Uysala, F. Severcana, b, Z. Evisa, c, n 2013 et al). Por lo tanto, se corroboró que no existen cambios químicos estructurales en la nHA utilizada para este proyecto.

Los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido demostraron una morfología de fibras lisas finas y continuas; preservando una disposición aleatoria y formando una red con distintos diámetros. Las 150 mediciones realizadas sobre micrografías digitales mediante el software "Image J", presentaron un diámetro promedio de 400nm. Un estudio anterior reportó haber utilizado la misma la técnica AJS para crear un recubrimiento para implantes formada de poliacetato de vinilo e hidroxiapatita, y describió haber obtenido una morfología de fibras dispuestas al azar y un diámetro promedio de las fibras de 370nm[33], esta morfología descrita es consistente con la nuestra. Nuestros resultados sugieren que al utilizar dicha técnica se obtendrán fibras de distintos diámetros, con promedios de 350nm a 400nm. Un estudio previo [Suárez F, 2017 et al] sintetizó andamios de policaprolactona mediante electrohilado y reportó haber obtenido fibras con diámetros que oscilan entre los 200nm y los 400nm, estos diámetros mimetizan a las fibras de colágena que forman parte de la (MEC) que miden de 50 a 500nm [29].

Los resultados de las pruebas mecánicas revelaron que cuando se adicionaron nHA en menor concentración (0.1%), se logró obtener grupos experimentales 1 con un módulo de Young de 1.71MPa, a diferencia de las obtenidas por parte de los de los grupos experimentales 2 que presentaron un módulo de Young 1.341MPa . Un estudio reciente sintetizó andamios compuestos a base de PLA al 10% y distintas concentraciones de cerámica mesoporosa SBA-15, donde se describió que al agregar la cerámica a



concentraciones mayores (5%, 7% y 10%) se disminuyen las propiedades mecánicas de los andamios. Sin embargo, describió un efecto contrario al adicionar concentraciones menores de cerámica (0.1% y 0.15%), donde la resistencia a la tensión y el módulo de Young se acercan a 114 GPa (tensión del hueso natural) y a 1.41GPa (Modulo de Young del hueso natural)[27]. Dichos resultados sugieren que a menor concentración de nHA, las propiedades mecánicas de los andamios se encontraran más acercadas a las propiedades mecánicas del tejido óseo. Esta modificación a las propiedades mecánicas puede adjudicarse a la introducción de nHA en las fibras de PLA[37]. En otro estudio reciente de andamios compuestos a base de (PLA / HA) sintetizados mediante la técnica AJS. [Abdal-hay 2015, et al] reportó haber obtenido una disminución en la resistencia mecánica al aumentar la concentración de nHA de 0.1gr a 0.3gr, concluyendo que el aumento de la concentración de nHA dentro de las fibras de PLA reduce la capacidad elástica de éstas, dando como resultado una disminución de la resistencia mecánica, estos resultados se asemejan a los nuestros, pues al aumentar la concentración de nHA de 0.1% a 0.5% a la solución de PLA al 10% el módulo elástico disminuyó de 1.74MPa a 1.341 MPa

Los resultados de proliferación celular demostraron ausencia de citotoxicidad en las células FPDH, al ser cultivadas durante 7 días con los grupos de estudio. Esto se corroboró mediante un ensayo de MTT, en el cual se observa una mayor proliferación celular en el grupo experimental 2 comparado con el grupo control y el grupo experimental 1. Nuestro hallazgo es consistente con los resultados obtenidos del estudio previo descrito por [Abdal-hay 2013, et al] quien cultivó osteoblastos MC3T3-E1 sobre andamios de (PLA) y (PLA / HA) sin reportar efectos citotóxicos, y describió que desde el día 1 hubo una mayor proliferación a favor del andamio compuesto (PLA / HA) estadísticamente significativa, en comparación con el andamio control (PLA), la cual fue mucho más evidente a los 7 días de incubación. Otro estudio publicado recientemente por [Álvarez Pérez, 2016 et al], reportó haber obtenido un aumento estadísticamente

significativo en la proliferación de células troncales mesenquimales derivadas de la medula ósea (BM-MSC) incubadas sobre andamios compuestos de (PLA / HA 7% y 10 %) sintetizados mediante AJS en comparación con la proliferación obtenida de andamios control (PLA 10%). Los resultados sugieren que al aumentar la concentración de nHA, la viabilidad celular se verá favorecida, ya que la cerámica de nHa confiere a los andamios la propiedad de interactuar con las células e incrementar la proliferación celular.

Los resultados de adhesión celular a las 24hrs y 48hrs de incubación mostraron diferencias significativas entre los 3 distintos grupos de estudio, siendo el grupo experimental 2 el que mayor adhesión reportó, por lo que se acepta la hipótesis, la adhesión celular se ve favorecida en los andamios experimentales 1 y 2.

## 6. CONCLUSIONES

- La técnica de hilado por propulsión de gas (AJS) permitió la síntesis de andamios microfibrilares de PLA 10%, PLA 10% + nHA 0.1% y PLA 10% + nHA0.5%.
- La adición de nHA disminuyó la elasticidad de los andamios compuestos en comparación con el andamio control PLA 10%.
- El andamio PLA 10% + nHA0.5% obtuvo la mayor adhesión y proliferación celular.
- El andamio PLA 10% + nHA 0.1% obtuvo las mejores propiedades mecánicas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: The first decade and beyond. *Journal of Cellular Biochemistry* 1998;72: 297-303.
- [2] Sill TJ, von Recum HA. Electro spinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 2008;29: 1989-2006.
- [3] Naderi H, Matin MM, Bahrami AR. Review paper: Critical Issues in Tissue Engineering: Biomaterials, Cell Sources, Angiogenesis, and Drug Delivery Systems. *Journal of Biomaterials Applications* 2011;26: 383-417.
- [4] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260: 920.
- [5] Braghirolli DI, Steffens D, Pranke P. Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics. *Drug Discovery Today* 2014;19: 743-753.
- [6] Suarez-Franco JL, VÁZquez-VÁZquez FC, Pozos-Guillen A, Montesinos JJ, Alvarez-Fregoso O, Alvarez-Perez MA. Influence of diameter of fiber membrane scaffolds on the biocompatibility of hPDL mesenchymal stromal cells. *Dental Materials Journal* 2018;advpub.
- [7] Stojanovska E, Canbay E, Pampal ES, Calisir MD, Agha O, Polat Y, Simsek R, Gundogdu NAS, Akgul Y, Kilic A. A review on non-electro nanofibre spinning techniques. *RSC Advances* 2016;6: 83783-83801.
- [8] Södergård A, Stolt M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science* 2002;27: 1123-1163.
- [9] Granados-Hernández MV, Serrano-Bello J, Montesinos JJ, Alvarez-Gayosso C, Medina-Velázquez LA, Alvarez-Fregoso O, Alvarez-Perez MA. In vitro and in vivo biological characterization of poly(lactic acid) fiber scaffolds synthesized by air jet spinning. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 0. Año volumen número paginas
- [10] Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontology* 2000 2015;67: 211-233.
- [11] Boskey AL. Biomineralization: An Overview. *Connective Tissue Research* 2003;44: 5-9.
- [12] Beniash E. Biominerals-hierarchical nanocomposites: the example of bone. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2011;3: 47-69.
- [13] Tajbakhsh S, Hajjali F. A comprehensive study on the fabrication and properties of biocomposites of poly(lactic acid)/ceramics for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* 2017;70: 897-912.
- [14] Brown WE, Eidelman N, Tomazic B. Octacalcium Phosphate as a Precursor in Biomineral Formation. *Advances in Dental Research* 1987;1: 306-313.
- [15] LeGeros RZ. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clinical Materials* 1993;14: 65-88.
- [16] Mann S. Molecular recognition in biomineralization. *Nature* 1988;332: 119-124.

- [17] Zakaria SM, Sharif SH, Othman MR, Yang F, Jansen JA. Nanophase Hydroxyapatite as a Biomaterial in Advanced Hard Tissue Engineering: A Review. *Tissue Engineering Part B-Reviews* 2013; 19: 431-441.
- [18] Tortora, G. and Derrickson, B. (2018). *Principios de anatomía y fisiología*. 11th ed. México: Médica Panamericana. pp. 183-196.
- [19] Hernández, T, (2016). *Síntesis y caracterización de fibras poliméricas de PLA-ZrO<sub>2</sub>* (Tesis de maestría).UNAM, CDMX. pp. 2-17.
- [20] Ñíguez Sevilla, B. (2016). *Estudio in vivo de la respuesta biológica del hueso inducida por una cerámica porosa de composición Ca<sub>7</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SiO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> - Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub> dentro del sistema binario fosfato tricálcico-silicato dicálcico*. tesis doctoral. Universidad de Murcia (España). pp. 15-34.
- [21] Carranza, F., Newman, M., Takei, H. and Klokkevold, P. (2010). *Periodontología clínica*. 10th ed. México: McGraw-Hill Interamericana. pp: 79-85
- [22] Martínez Hernández, D. (2010). "Determinación experimental de las propiedades mecánicas de tejido óseo". Tesis de maestría. Instituto de investigaciones en materiales. pp.12-30.
- [23] Luque Sendra, M. (2009). *Estudio de la morfología del cuerpo vertebral en una l4 humana con modelos de remodelación ósea interna y externa*. Tesis. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Sevilla. pp. 37-71.
- [24] Roesler, H. (1987). The history of some fundamental concepts in bone biomechanics. *Journal of Biomechanics*, 20(11-12), pp.1025-1034.
- [25] Robling, A., Castillo, A. and Turner, C. (2006). Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8(1), pp.455-498.
- [26] Elices, M. (2000). *Structural biological materials*. 1st ed. Amsterdam: Pergamon. pp. 397-420.
- [27] Chanes, C, (2016). *Preparación de un composite a partir de cerámica mesoporosa tipo SBA-15 y fibras de PLA* (Tesis de maestría). UNAM, CDMX. pp. 3-24.
- [28] Rezwan, K., Chen, Q., Blaker, J., &Boccaccini, A. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18), 3413-3431.
- [29] Hernández, T, (2016). *Síntesis y caracterización de fibras poliméricas de PLA-ZrO<sub>2</sub>* (Tesis de maestría). UNAM, CDMX. pp. 2-17.
- [30] Jiang, T., Carbone, E., Lo, K. and Laurencin, C. (2015). Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. *Progress in Polymer Science*, 46, pp.1-24.
- [31] Chen, H., Truckenmüller, R., Van Blitterswijk, C. and Moroni, L. (2013). Fabrication of nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Nanomaterials in Tissue Engineering*, pp.158-183.
- [32] Smith, I., Liu, X., Smith, L. and Ma, P. (2009). Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(2), pp.226-236.

- [33] Abdal-hay, A., Hamdy, A., Khalil, K., & Lim, J. (2015). A novel simple one-step air jet spinning approach for deposition of poly(vinyl acetate)/hydroxyapatite composite nanofibers on Ti implants. *Materials Science And Engineering: C*, 49, 681-690.
- [34] Uysal, I., Severcan, F. and Evis, Z. (2013). Characterization by Fourier transform infrared spectroscopy of hydroxyapatite-co-doped with zinc and fluoride. *Ceramics International*, 39, pp.7727-7733.
- [35] Bonassar LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: The first decade and beyond. *Journal of Cellular Biochemistry* 1998;72: 297-303.
- [36] Sun, L., Danoux, C., Wang, Q., Pereira, D., Barata, D., & Zhang, J. et al. (2016). Independent effects of the chemical and microstructural surface properties of polymer/ceramic composites on proliferation and osteogenic differentiation of human MSCs. *Acta Biomaterialia*, 42, 364-377.
- [37] Wang, T., Chow, L., Frukhtbeyn, S., Ting, A., Dong, Q., Yang, M. and Mitchell, J. (2011). Improve the strength of PLA/HA composite through the use of surface initiated polymerization and phosphonic acid coupling agent. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 116(5), p.785.
- [38] Abdal-hay, A., Sheikh, F., & Lim, J. (2013). Air jet spinning of hydroxyapatite/poly(lactic acid) hybrid nanocomposite membrane mats for bone tissue engineering. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, 102, pp. 635-643.
- [39] Jones, Julian R, *Scaffolds for tissue engineering*, Imperial College London , Uk. pp. 964-973.
- [40] Granados H, Marco, (2018). *Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración de tejidos (Tesis de doctorado)*. UNAM. CDMX. pp. 39-59.
- [41] Suárez F. José, (2017). *Caracterización de membranas Electro-hiladas para su aplicación en el área dental. (Tesis de doctorado)*. UNAM. CDMX. pp. 31-43.
- [42] Álvarez Pérez, M. (2016). *Biocompatibilidad de andamios nanofibrilares con diferentes concentraciones de pla/hidroxiapatita*. *Odovtos - International Journal of Dental Science*, pp.39-50.