



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE ANDAMIOS DE POLI (L-
LACTIDA) CON HIDROXIAPATITA PURA E INJERTADA PARA LA
REGENERACIÓN DE TEJIDO DURO.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A**

M.C. LUIS JESÚS VILLARREAL GÓMEZ

Tijuana, B. C.

AGOSTO 2013

El presente trabajo de investigación fue realizado en los Laboratorios
De la Facultad de Medicina y Psicología se utilizaron tres instalaciones.

Laboratorio 4: Área de Histología

Zooterio: Experimentación animal

Del Centro de Ingeniería y Tecnología, CITEC

Laboratorios de Bioingeniería

Del Centro de Ciencias de la Salud, CISALUD

Laboratorio de Histopatología

Del Instituto de Investigación en Materiales UNAM

Laboratorio de síntesis de polímeros

Bajo la Dirección y Tutoría del
**DR. RICARDO VERA GRAZIANO, DR. HORACIO ALMANZA REYES
Y EL DR. JOSE MANUEL CORNEJO BRAVO**

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento del
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
Ciencia Básica SEP-CONACYT (CB 2010-1-157173).

AGRADECIMIENTOS

Le doy primero gracias a Dios por darme la vida y por hacerme feliz en ella, por darme una hermosa familia que me ama, ellas son la razón de mi empeño por ser mejor, por seguir preparándome para llegar a ser alguien que pueda impactar la vida de otras personas con mi trabajo, gracias por amarme, mis queridas y preciosas hijas Kiara Yosseline y Danna Carolina, y sobre todo, gracias por amarme mi amor, mi esposa, mi compañera Lizeth, gracias por hacerme tan feliz, tú me convertiste en una persona ambiciosa, te debo a ti todos los logros profesionales que he tenido, te amo.

Gracias a la Dra. Irma Esthela Soria Mercado, por seguir apoyándome aunque ya no sea su estudiante, en usted veo una figura materna a la cual le debo mi respeto y mi necesidad de demostrarle que puedo llegar a ser exitoso, gracias por ser la persona que es. Le agradezco al Ing. Rubén Roa Quiñonez, Patricia Avitia, Edgar Chávez Moreno, Michelle Hallack Alegría Ana Leticia Iglesias y Norma Barboza Tello, por permitirme terminar mi doctorado y apoyarme en todo momento, el Centro de Ingeniería y Tecnología, Unidad Valle de las Palmas de la Universidad Autónoma de Baja California, se ha convertido en mi segundo hogar y donde me convertiré en un profesor e investigador exitoso. Gracias a Ana, Claudia, Patricia Lilian Alejandra, Susy, Karla, Martha María, Víctor, Cristina, por su valiosísima amistad, con ustedes en mi trabajo, lo disfruto muchísimo. Gracias también en especial a Edgar Chávez por todos sus consejos.

Le doy gracias al Dr. José Manuel Cornejo Bravo, por apoyarme en todo momento en el transcurso de esta tesis, en todo momento me sentí resguardado bajo su alas, bajo su guianza y conocimiento, gracias doctor por su enorme paciencia hacia mí y su total confianza, me ayudaron a realizar este enorme trabajo, gracias por darme la oportunidad. En ciencias químicas no pude haber encontrado mejor director y tutor que usted. Dios lo puso en mi camino para que me fuera bien. Al Dr. Ricardo Vera Graziano por haber creído en mí y por estar al pendiente de mis avances, por haberle dado dirección y rumbo a mi tema de tesis. Gracias por haber co-dirigido este trabajo. A la Dra. María Raquel Vega Ríos, Dr. José Luis Pineda Camacho, Dra. Paris Astrid Mier Maldonado y sobre todo al Dr. Horacio Almanza Reyes, por haberme ayudado a realizar los experimentos, sin su invaluable ayuda no hubiera podido realizarlo, espero y sigamos colaborando como lo hemos estado haciendo. Al Dr. Ricardo Vera Graziano, Dr. José Manuel Cornejo Bravo, Dra. Aracely Serrano, Dr. Luis Enrique Gómez Pineda y al Dr. Horacio Almanza Reyes, por formar parte de mi comité de tesis y revisar todos mis avances, les agradezco a todos su apoyo y profesionalidad para hacer de este trabajo un trabajo de calidad.

Le agradezco al CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA, por haber financiado la realización de los experimentos a través de la convocatoria de Ciencia Básica SEP-CONACYT (CB 2010-1-157173). Y por último a ti, por dedicarle tiempo de tu vida a leer estas líneas, gracias.

TABLA DE CONTENIDO	PAG.
Tabla de contenido.....	4
Índice de Figuras.....	8
Índice de Tablas.....	10
Abreviaturas.....	12
Resumen.....	13
I. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Pruebas y estándares.....	18
1.2. Efectos secundarios.....	19
1.3. Reacciones locales.....	19
1.4. Factores de biocompatibilidad.....	21
1.5. Respuesta tisular.....	21
1.6. Filtración bacteriana.....	22
1.7. Contracción de los materiales.....	22
1.8. Estrés causado por el procedimiento de restauración.....	23
II. MARCO TEÓRICO.....	23
2.1. Ingeniería de tejidos.....	23
2.1.1. Generalidades.....	23
2.1.2. Andamios para regeneración de tejidos.....	24
2.1.3. fabricación de andamios para ingeniería de tejidos.....	27
2.1.4. Electrohilado.....	27
2.2. Biomateriales para regeneración ósea.....	28

2.2.1. Metales.....	28
2.2.2. Cerámicos.....	29
2.2.3. Polímeros.....	30
2.2.4. Materiales compuestos.....	31
2.2.4.1. Hidroxiapatita.....	31
2.2.4.1.1. Eventos que suceden durante la interacción hidroxiapatita-célula.	32
2.2.4.2. Poli (ácido láctico).....	34
2.2.4.2.1. Síntesis.....	34
2.2.4.2.2. Propiedades.....	35
2.2.4.2.3. Biocompatibilidad.....	36
2.2.4.2.4. Aplicaciones.....	37
2.2.4.3. Caracterización de andamios PLLAHA y PLLAHAINJ.....	39
2.3. Evaluación de biocompatibilidad.....	42
2.3.1. Biocompatibilidad.....	42
2.3.1.1. Respuesta inmunológica a materiales implantados.....	43
2.3.1.1.1. Rol de las proteínas adsorbidas en la respuesta tisular a los biomateriales.....	43
2.3.1.1.2. Las células y tejidos responden a fuerzas mecánicas.....	44
2.3.1.1.3. Inflamación granulomatosa.....	44
2.4. Ensayos para evaluación de la biocompatibilidad.....	49
2.4.1. Ensayos <i>in vitro</i>	49

2.4.2. Ensayos <i>in vivo</i>	50
III. JUSTIFICACIÓN.....	53
IV. HIPÓTESIS.....	55
V. OBJETIVOS.....	55
5.1. Objetivo general.....	55
5.2. Objetivos específicos.....	55
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
6.1. Reactivos biológicos y químicos.....	56
6.2. Equipo.....	57
6.3. Protocolos generales.....	58
6.4. Cultivo celular.....	59
6.5. Número y crecimiento celular.....	60
6.6. Ensayos de viabilidad celular: MTT e incorporación de rojo neutro.....	61
6.6.1. Fundamento de la reducción de MTT.....	61
6.6.2. Fundamento de la incorporación de rojo neutro.....	61
6.6.3. Metodología para los ensayos de viabilidad celular MTT e incorporación de rojo neutro.....	62
6.6.4. Análisis estadístico de los ensayos de viabilidad celular.....	63
6.7. Animales de experimentación.....	63
6.7.1. Creación de grupos de estudio.....	64
6.7.1.1. Lectura de peso de las ratas Wistar.....	65

6.7.1.2.	Cuidados antisépticos.....	65
6.8.	Prueba de sensibilización cutánea.....	66
6.9.	Prueba de implantación.....	67
6.9.1.	Estudio histopatológico.....	68
6.9.2.	Análisis estadístico.....	68
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	70
7.1.	Descripción de las muestras.....	70
7.1.1.	Preparación de las muestras.....	70
7.2.	Ensayo de adhesión de células bacterianas.....	71
7.3.	Ensayo de difusión en disco de los andamios PLLAHA y PLLAHAINj en biopelículas bacterianas.....	72
7.4.	Ensayos de Viabilidad celular: MTT e incorporación de rojo neutro	74
7.4.1.	Análisis estadístico.....	77
7.5.	Ensayos <i>in vivo</i>	77
7.5.1.	Ensayo de sensibilización cutánea.....	77
7.5.1.1.	Control Positivo.....	78
7.5.2.	Prueba de implantación.....	85
VIII.	CONCLUSIONES.....	98
IX.	REFERENCIAS.....	100
X.	ANEXO I.....	108
XI.	ANEXO II.....	115
XII.	ANEXO III.....	117

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
Figura 1. Lesiones rojas erosivas o blanca/liquenoides en la mucosa oral.....	20
Figura 2. Polímeros biodegradables utilizados en aplicaciones biomédicas.....	31
Figura 3. Los diferentes niveles de organización del hueso natural.....	32
Figura 4. Síntesis del ácido poli (L-láctico).....	35
Figura 5. Esquema de degradación del PLLA en el organismo.....	36
Figura 6. Ensayo de inmunofluorescencia donde se visualiza la vinculina de células madre mesenquimales cultivadas sobre andamios de PLLA, PLLAHA4inj, PLLAHA10inj, PLLAHA20inj y PLLAHA30inj.....	41
Figura 7. Las interacciones celulares con superficies extrañas son mediadas por receptores de integrinas con proteínas de adhesión adsorbidas en la superficie del material.....	44
Figura 8. Ciclo de incapacidad de digestión del cuerpo extraño.....	45
Figura 9. Proceso de formación del granuloma.....	46
Figura 10. Micrografía que presente diferentes granulomas.....	47
Figura 11. Micrografía que presenta células gigantes multinucleadas.....	48
Figura 12. Matriz de evaluación de biocompatibilidad ISO 10993-1.....	52
Figura 13. Prueba de crecimiento celular.....	60
Figura 14. Reacción de reducción de MTT a formazán.....	61
Figura 15. Prueba de irritación cutánea.....	67

Figura 16. Prueba de implantación.....	68
Figura 17. Fibras de poli (L-lactida) con hidroxiapatita injertada.....	70
Figura 18. Ensayo de difusión en disco, los andamios PLLAHA y PLLAHAINJ fueron evaluados con <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	73
Figura 19. Líneas celulares utilizadas en los ensayos de viabilidad celular.....	75
Figura 20. Resultados de la reducción de MTT a) células C2C12 y b) células BCAEC, e incorporación de rojo neutro, c) células C2C12, d) células BCAEC. Las barras representan la desviación estándar correspondiente (n= 3).....	76
Figura 21. Toma de muestra de tejido para el análisis histológico.....	79
Figura 22. Materiales implantados en el músculo de la pata de la rata (<i>Biceps Femoris</i>) después de 47 días de haber sido implantado el material.....	89
Figure 23. Andamios de PLLAHA y PLLAHAINJ en tejido muscular.....	90
Figura 24. Comparación de los diferentes materiales a través de la gráfica de cajas y bigotes, calculada en Minitab®.....	97

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	Pág.
Tabla 1. Algunas propiedades del PLLA en comparación con el acero y el hueso cortical.....	36
Tabla 2. Materiales para implantes óseos.....	38
Tabla 3. Resumen de ensayos <i>In vitro</i> e <i>In vivo</i> que se llevaron a cabo para evaluar la biocompatibilidad de los andamios de poli(L-lactida) con hidroxiapatita pura e injertada.....	58
Tabla 4. Grupos de estudio ensayo de sensibilidad cutánea (cuatro ratas por grupo: tres muestras y un control) y grupos de estudio ensayo de Implantación (cuatro ratas por grupo).....	65
Tabla 5. Diferentes variaciones de material de andamios de PLLAHA.....	70
Tabla 6. Ensayo de adhesión bacteriana.....	72
Tabla 7. Análisis de varianza de un factor calculada a partir de los resultados de los ensayos de viabilidad celular.....	77
Tabla 8. Toma de muestra después de cinco días después de haber sido implantado los materiales.....	80
Tabla 9. Resultados del estudio histopatológico.....	82
Tabla 10. Resultados de la prueba de sensibilidad cutánea, muestras de tejido subcutáneo tomados después de 5, 33 y 99 días de la implantación.....	83
Tabla 11. Extracciones de los andamios PLLAHA y PLLAHAinj a los 99 días de la implantación en el tejido subcutáneo.....	85

Tabla 12. Aumento de peso de las ratas Wistar implantadas en gramos, después de transcurrir 47 y 96 días del procedimiento quirúrgico.....	86
Tabla 13. Resultados de la prueba de implantación, muestras de tejido muscular tomados después de 47 y 96 días de la implantación.....	86
Tabla 14. Estudio histopatológico de los andamios PLLAHA y PLLAHAINJ a los 47 días del implante.....	93
Tabla 15. Nomenclatura utilizada para clasificar los niveles de respuesta tisular observada en los tejidos adyacentes a los implantes.....	94
Tabla 16. Valores cuantitativos de los andamios PLLAHA y PLLAHAINJ en los diferentes días de toma de muestra y cálculos estadísticos básicos del software Excel Microsoft®	95
Tabla 17. Resultados del análisis de varianza.....	96

Abreviaturas

μg	Microgramo
$\mu\text{L}/\text{mL}/\text{L}$	Microlitro/mililitro/litro
μm	Micrómetro
5-FOA	Ácido 5-fluoro-orótico
ADA	American Dental Association
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANSI	American National Standards Institute
BCAEC	Bovine Coronary Artery Endothelial Cells
BMPs	Proteínas osteoinductivas
CLQ	Cloroquina
C2C12	Células de músculo de mioblasto de ratón
DMEM	Dulbecco's Modified Tagle Médium
DMSO	Dimetil Sulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Tetraacético Etilen-Dinitrilo
FDA	Federal Drug Administration
HA	Epítotope de hemaglutinina
ISO	International Organization for Standardization
kDa	Kilodalton
KERP1	Proteína rica en lisina y ácido glutámico
LB	Luria-bertani
LB-Amp	Luria-bertani con ampicilina
mM/M	Milimolar/molar
PLLAHA	Poli (L- lactida) con Hidroxiapatita pura
PLLAHAinj	Poli (L- lactida) con Hidroxiapatita injertada
PMMA	Poli (metilmetacrilato)
SBF	Solución búfer de fosfatos
siARN	Ácido ribonucleico de cadena simple
Tg	Temperatura de transición vítrea
Tm	Temperatura de transición cristalina

RESUMEN

El daño total o parcial de tejido y la pérdida de función de un órgano se encuentran entre los problemas más graves y costosos de la salud humana. Este tipo de complicaciones se han afrontado mediante trasplantes de órganos y tejidos alogénicos, sin embargo, debido a la escasa disponibilidad de donantes, surge la necesidad de crear andamios que asemejen la matriz extracelular, y facilitar la regeneración de tejido. Estos andamios ofrecen propiedades mecánicas excelentes y son biocompatibles. Por tal motivo, el objetivo de este proyecto es la evaluación de la biocompatibilidad de andamios de poli (L-lactida) con hidroxiapatita pura e injertada a concentraciones diferentes de refuerzo en tejido muscular y subcutáneo, para así llevarlos a la aplicación de regeneración de tejido duro. Entre los ensayos de biocompatibilidad *in vitro*, para evaluar la adhesión celular y citotoxicidad bacteriana se utilizaron las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, además, para evaluar si los materiales provocan citotoxicidad en células C2C12 y BCAEC se utilizaron los ensayos de reducción de MTT e incorporación de rojo neutro. Se realizaron ensayos *in vivo* en ratas Wistar, implantando el material en tejido subcutáneo y muscular por 1, 4 y 14 semanas. Evaluándolos a través de frotis con hematoxilina-eosina. Ninguna de las variantes de los andamios indujeron un efecto tóxico en la viabilidad celular, y de hecho aumentaron la proliferación celular en los ensayos *in vitro*; en los ensayos *in vivo*, provocaron una respuesta inflamatoria desde leve a moderada, sin presentar necrosis tisular. Estos resultados evidencian que existe un reconocimiento a los materiales por el sistema inmunológico, sin embargo, no provocó una respuesta violenta que dañe el tejido

circundante. Esto puede implicar que los materiales al ser implantados para su aplicación en tejido duro puede provocar una reacción leve y tolerable a largo plazo. Este proyecto demostró que los andamios de PLLAHA y PLLAHAINJ son totalmente biocompatibles en las células C2C12, células BCAEC, en las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, en tejido subcutáneo y muscular de rata.

I. INTRODUCCIÓN

Cuando se habla de biocompatibilidad de materiales que van a ser implantados en un organismo vivo podemos encontrar varias definiciones, entre ellas podemos encontrar que la biocompatibilidad es considerada como la cualidad de un material de ser compatible con el entorno biológico, es decir, la capacidad del material para interactuar con los tejidos vivos, sin causar daño o muy pocas reacciones biológicas. Cuando nos referimos específicamente a un material dental, lo consideramos como "biocompatible" si sus propiedades y su función coincide con el entorno biológico del cuerpo y sin causar reacciones no deseadas.

En cirugía un biomaterial, material biocompatible o material bioaplicable es el material que puede ser utilizado en algún implante o prótesis.

En términos médicos un biomaterial es un compuesto farmacológicamente inerte para ser implantado o incorporado dentro del sistema vivo. En este sentido, el biomaterial se implanta con el objeto de sustituir o regenerar tejidos vivientes y sus funciones.

En realidad son muy pocos los materiales biocompatibles que son aceptados por todo el cuerpo, de ahí que no pueda clasificarse un material como tal de forma definitiva. La biocompatibilidad también puede estar definida como la propiedad de un material de funcionar en una aplicación específica en presencia de una respuesta de huésped apropiada. De acuerdo con EN 1441 (European Committee for Standardization 1996) los materiales biocompatibles deben de ser libres de cualquier riesgo. La biocompatibilidad de estos materiales endodónticos es caracterizada con muchos

parámetros como genotoxicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad, citotoxicidad, histocompatibilidad o expulsión microbiana. Es imposible la caracterización biológica de los materiales con una sola prueba ya que las propiedades de los materiales necesitan ser investigadas por un conjunto de pruebas *in vitro* e *in vivo* (Hauman, C.H.J. and Love, R.M. 2003).

Desafortunadamente, no se tienen definiciones precisas o mediciones adecuadas de biocompatibilidad. Frecuentemente, biocompatibilidad está definida en términos de su funcionalidad o éxito en una actividad específica. Por ejemplo, para un paciente donde su sistema inmunológico aceptó correctamente una prótesis vascular de Dacrón implantada, y esta prótesis le permite al paciente tener una circulación sanguínea que le permite sobrevivir, algunos pueden discutir que esta prótesis no es biocompatible, ya que la prótesis probablemente no recelularice (a pesar de que haya sido diseñada con ese propósito) y también provoca embolias, tal vez la embolia en este caso tenga muy poca significancia clínica, porque el paciente está vivo y sigue vivo, ya que sin la prótesis vascular el paciente no hubiera podido sobrevivir (Ratner, B.D. et al. 2004).

Autian (1970) fue el primero en proponer a la biocompatibilidad como un “concepto” que consiste en tres niveles: a) toxicidad no específica (cultivos celulares o animales pequeños de laboratorio); b) toxicidad específica (pruebas de uso; como por ejemplo, en primates); c) pruebas clínicas en humanos. El término no específico se refiere a sistemas de pruebas que no reflejan la aplicación del material en una situación clínica, mientras que el término específico aplica el uso de modelos biológicos que simulan el actual uso clínico del material. La siguiente secuencia fue adoptada por la ISO

(1984) en un reporte técnico 7405, el cuál menciona los siguientes niveles: 1) pruebas iniciales (citotoxicidad, mutagenicidad); 2) pruebas secundarias (sensibilización, pruebas de implantación, irritación de la mucosa); y 3) pruebas de uso. En ambos conceptos, los materiales recién desarrollados pueden ser sometidos, a los tres niveles de prueba en la misma secuencia que se menciona previamente, desde las pruebas *in vitro* hasta el uso de animales de prueba y el uso de pruebas preclínicas y clínicas en humanos (Hauman, C.H.J. and Love, R.M. 2003).

El tema de la biocompatibilidad es especialmente relevante en el campo de la endodoncia debido a que el éxito de los tratamientos depende, en gran parte, de los materiales que se mantienen en contacto con los tejidos durante largos periodos de tiempo. Desafortunadamente, no existe una sustancia inerte, por lo que es fundamental realizar las debidas pruebas para poder elegir materiales que reúnan las mejores propiedades clínicas deseadas (Hauman, C.H.J. and Love, R.M. 2003).

Distintos motivos han ocasionado un desarrollo y perfeccionamiento de las pruebas *in vitro*, principalmente la preocupación de los profesionales de la salud ante el aumento de las demandas por responsabilidad profesional y la promulgación de distintas normas y reglamentos que buscan un desarrollo tecnológico que permitan un bienestar humano que no se dé a expensas del maltrato a otras especies (Hauman, C.H.J. and Love, R.M. 2003).

Idealmente, un material dental que va a ser usado en la cavidad oral no debe causar ningún tipo de daño a ningún tejido oral (gingiva, mucosa, pulpa y hueso). Además debe contener sustancias que no sean tóxicas y que no se difundan, ya que

pueden ser absorbidas por el torrente circulatorio, causando respuestas tóxicas sistémicas, incluyendo efectos teratogénicos y carcinogénicos. El material también debe estar libre de agentes que sensibilizan o causan alergias a pacientes.

Si los materiales dentales causan alguna reacción no deseada, esta puede ser local o sistémica. Las reacciones locales involucran gingiva, tejido de la mucosa, pulpa y tejido del diente, incluyendo el desgaste excesivo sobre el diente opuesto de los materiales de restauración. Las reacciones sistémicas son expresadas generalmente como reacciones alérgicas de la piel.

1.1. Pruebas y Estándares

El ambiente oral es especialmente hostil para los materiales dentales de restauración. La saliva tiene propiedades corrosivas, y hay bacterias presentes. Este ambiente demanda apropiadas pruebas biológicas y estándares que evalúan cualquier material que será usado en la cavidad oral. (Stanley, H.R. 1985; Mjör, I.A. 1991; Bolewska, J. 1990).

De acuerdo con los estándares existentes, los materiales dentales deben de pasar por pruebas primarias que indican la respuesta celular, pruebas secundarias que evalúan la respuesta en tejido y las pruebas de uso en animales, antes de ser evaluados clínicamente en humanos.

Los programas de prueba para materiales dentales están basados en base a las especificaciones o estándares establecidos por las organizaciones que estandarizan ya sea internacionalmente o nacionalmente, tales como “American National Standards Institute (ANSI)” y “International Standards Organization (ISO)”. Uno de los estándares

utilizados más antiguos ha sido el descrito por la especificación #41 de ADA/ANSI. La evaluación de los productos dentales para la seguridad y eficacia ha sido de interés especial por “American Dental Association ADA” y “Federal Drugs Administration FDA”. La “U.S. Medical Device Amendments of 1976” fue la primera regulación que enfatizó la necesidad de la estandarización de pruebas biológicas en materiales dentales, así como materiales usados en la medicina. De acuerdo a estas regulaciones, todos los materiales dentales son revisados por seguridad y efectividad y son clasificadas por la FDA como clase I, II y III de acuerdo al riesgo.

Los materiales de clase I son aquellos que están considerados a ser de bajo riesgo en causar reacciones adversas y solo requieren de controles generales. Los materiales de clase II deben satisfacer los requerimientos descritos por ANSI/ADA. Los materiales de clase III, requieren de pruebas extensas, que incluyen prioritariamente su seguridad y eficacia antes de su mercadotecnia. La FDA regula los componentes de las amalgamas dentales y los clasifica.

1.2. Efectos secundarios

Las reacciones en los materiales dentales dependen de su composición química y en los productos que se generan en su degradación, absorción, acumulación y otros factores asociados con sustancias filtrables provenientes de la restauración.

1.3. Reacciones locales

Lesiones rojas erosivas o blancas/liquenoides en la mucosa oral (Figura 1) han sido reportados que tienen relación directa con amalgamas dentales, compuestos y otros materiales restauradores (Bolewska, J., 1990). Por otro lado, Hietanen et al.

(1987), no encontró evidencia de hipersensibilidad de materiales restauradores dentales en pacientes con el plano de liquen oral.



Figura 1. Lesiones rojas erosivas o blanca/licuénoides en la mucosa oral.

En parte, estas reacciones locales pueden ser en origen alérgicas (Kaaber, S. 1990), presentándose en el sitio de exposición o pueden ser tóxicos en la naturaleza (Hensten-Pettersen, A. and Jacobsen, N. 1991), mostrando efectos irritantes directos en el sitio de exposición, en cada caso la causa es difícil de determinar. Algunos materiales dentales que han sido reportados contienen componentes que son alérgenos comunes como el cromo, cobalto, mercurio, eugenol, componentes que forman parte de resinas y formaldehído (Brodin, P., 1982).

La concentración y tiempo de exposición son dos factores muy importantes. Muchos materiales, incluyendo sal de mesa, agua y mercurio pueden ser tóxicos a altas concentraciones, inclusive sustancias potencialmente tóxicas pueden no ser ningún problema ya que son neutralizadas por mecanismos fisiológicos normales a bajas

concentraciones y tiempo de exposición. En la cavidad oral, la concentración y tiempo de exposición es mitigado por efectos de filtrado en dentina, el esmalte y los materiales base que se encuentran entre el material restaurador y la pulpa (Stanley, H.R. 1991).

Haciendo a un lado la concentración, el tiempo de exposición y los efectos de filtración, se deben de considerar procesos que pueden influenciar a una reacción de la pulpa, por ejemplo; un procedimiento de restauración puede venir acompañado de corte mecánico, presión donde se hizo el procedimiento, efectos de deshidratación, exposición bacteriana, procedimientos utilizando ácidos, adherencia del esmalte o dentina, etc.

1.4. Factores de Biocompatibilidad

En el área del diseño de materiales dentales para restauración, es indispensable tomar en cuenta la biocompatibilidad del material con el organismo humano. Los estudios relacionados a biocompatibilidad incluyen respuesta tisular, filtración bacteriana en la interface del diente, contracción del material y estrés creado en la estructura del diente en los procedimientos de restauración.

1.5. Respuesta tisular

Los materiales de restauración pueden provocar respuestas en la pulpa, gingiva y mucosa oral. La pulpa puede ser irritada de varias maneras, ya sea por corte mecánico, procedimientos mecánicos que involucran la preparación de la cavidad dental y los materiales de restauración, micro filtración potencial de los componentes del material, mala colocación del material, micro filtración bacteriana en los márgenes de la restauración causada por una mala colocación del material y agentes como el ácido

usados para preparar la cavidad oral y asegurar la unión de los materiales de restauración, severa irritación prolongada puede llevar a daño irreversible del tejido pulpar.

Algunos materiales dentales de restauración han sido reportados que causaron lesiones en la pulpa cuando son colocados a 1.5 mm de la pulpa, lesiones irreversibles cuando son colocados a longitudes menores de 1.0 mm, y menores 0.5 mm, del tejido humano pulpar (Stanley, H.R. 1991).

Algunos agentes de revestimiento apropiados son útiles para prevenir lesiones severas. Algunos agentes como hidróxido de calcio, actúan estimulando la formación de dentina secundaria, mientras otros como los cementos de ionómero de vidrio protegen la dentina y esmalte de la filtración de bacteria o los componentes de los materiales de restauración.

1.6. Filtración bacteriana

La presencia de bacteria en las áreas libres o interface, después de la colocación de los materiales de restauración a causa de la filtración bacteriana, es la mayor amenaza para la pulpa, inclusive más que la composición potencialmente tóxica de algunos materiales de restauración (Bergenholtz, G. 1989).

1.7. Contracción de los materiales

Este problema está relacionado a los compuestos de los materiales, y puede ocurrir cuando los materiales restaurativos son unidos a la superficie del diente, creando estrés cuando el conjunto polimérico es contraído en el diente. Entre más grande sea la cavidad y más grande sea la masa de la restauración, mayor puede ser la

contracción. La contracción del material puede ser causada por la sensibilidad a la post restauración. El grado de unión y contracción del material afectará una apertura mayor en los márgenes de la restauración que permitirá a la bacteria filtrarse debajo del material.

7.8. Estrés causado por el procedimiento de restauración

Algunas veces los materiales de restauración son forzados en los túbulos dentinales abiertos y los gradientes de presión pueden ser incrementados al forzar su colocación en el tejido vivo.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Ingeniería de Tejidos

2.1.1. Generalidades

La Ingeniería de tejidos, también conocida como medicina regenerativa o terapia celular (según el autor este último término también puede ser considerado como un campo de la medicina regenerativa y no serían términos sinónimos), es la rama de la bioingeniería que se sirve de la combinación de células, métodos de ingeniería de materiales, bioquímica y fisicoquímica para mejorar o reemplazar funciones biológicas.

Mientras la mayoría de definiciones de la ingeniería de tejidos cubre un amplio rango de aplicaciones, en la práctica el término está íntimamente relacionado con las aplicaciones de reparar o reemplazar parcial o totalmente tejidos (por ejemplo hueso, cartílago, válvula cardiaca, vejiga, etc.).

A menudo, los tejidos implicados requieren ciertas propiedades mecánicas y estructuras para su propia función.

En el fondo incluye también las transfusiones, trasplantes, terapias génicas...

Esta ingeniería es una especialidad que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida a la fabricación de sustitutos biológicos que mantengan, mejoren o restauren la función de órganos y tejidos en el cuerpo humano. De naturaleza eminentemente interdisciplinaria, la ingeniería de tejidos incluye conceptos de ramas tan diversas como la biología celular, la micro fabricación, la robótica y la ciencia de los materiales para diseñar partes de reemplazo del cuerpo humano.

El término ha sido también aplicado a los esfuerzos de diseño de funciones bioquímicas usando células junto con sistemas de soporte creados artificialmente (como por ejemplo un páncreas artificial o hígado artificial).

Otra manera de definir a la ingeniería de tejidos es como una ciencia que utiliza los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida desarrollando sustitutos biológicos que reparen o mejoren la función biológica de un tejido u órgano, basándose en el uso de tres elementos principales: biomateriales, células y andamios. Los andamios para regeneración de tejido deben de poseer una serie de requisitos tales como: poseer una estructura porosa con el fin de favorecer la angiogénesis y vasculogénesis, ser biocompatibles, biodegradables, poseer adecuadas propiedades mecánicas y una superficie química que favorezca la adhesión, diferenciación y proliferación celular.

La regeneración de tejidos es necesaria cuando se presentan situaciones fisiológicas o patológicas que provocan la pérdida de tejido (Velazco, G. 2011). Entre las patologías o situaciones que provocan esta disminución de tejido tenemos al envejecimiento, osteoporosis, pérdida dentinal, distrofia muscular de Duchenne

(seudohipertrófica) (se presenta en la infancia temprana), distrofia muscular de Becker (entre los 2 y 16 años de edad), distrofia muscular de Emery-Dreifuss (se presenta en la adolescencia temprana), entre otras (Muscular Dystrophy Association of the United States, 2004).

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario que involucra la aplicación de los principios y métodos de la ingeniería y ciencias de la vida, para llegar al entendimiento fundamental de la relación estructura-función en tejido normal y patológico de un organismo así como el desarrollo de los sustitutos que restauran, mantienen o mejoran la función tisular. Uno de los objetivos principales de la ingeniería de tejidos es superar las limitaciones y tratamientos convencionales basados en el trasplante de órganos e implantes de biomateriales, esta área de estudio no solo posee el potencial para producir una gran variedad de órganos artificiales que son tolerados inmunológicamente sino sustitutos de tejido que pueden crecer junto con el paciente (Sachlos, E. and Czernuszka, J.T. 2003).

2.1.2. Andamios para regeneración de tejidos

Entre los principales métodos que podemos encontrar en la ingeniería de tejidos está incluido el crecimiento "*in vitro*" de células de interés en una estructura tridimensional (3D) del órgano o tejido requerido. Sin embargo, las células no poseen la habilidad de crecer a favor de las orientaciones 3D que definen la forma anatómica del tejido, en vez de esto, las células migran aleatoriamente para formar tejidos o capas bidimensionales 2D. A pesar de esto, las estructuras 3D son requeridas, y esto es logrado cultivando las células en estructuras porosas tridimensionales conocidas como

“andamios”, en donde las células colonizan y proliferan (Sachlos, E. and Czernuszka, J.T. 2003).

Características generales de los andamios para ingeniería de tejidos

- Ser biocompatible (no provoca repulsión, inflamación, respuesta inmune o reacción a cuerpo extraño).
- Proveedor de una estructura tridimensional para que las células puedan adherirse y así promover su crecimiento.
- Ser altamente poroso con una superficie amplia para permitir absorción celular, interacción material-células, crecimiento de tejido en el interior y transporte de nutrientes y oxígeno.
- Ser biodegradable bajo condiciones fisiológicas y la degradación debe de avanzar acorde a la regeneración tisular para sostener la funcionalidad del tejido.
- Poseer propiedades mecánicas aceptables a la aplicación del material.
- Ser soporte para las células que sintetizan los componentes de la matriz extracelular y los factores de crecimiento requeridos para el crecimiento tisular sano.
- Se fácilmente esterilizable para evadir contaminación tóxica sin comprometer la estructura y propiedades mecánicas del material.
- Por último, el proceso de producción del andamio con las únicas características antes mencionadas deben ser reproducible, económico y escalable (Horst, M., et al. 2010).

2.1.3. Técnicas para la fabricación de andamios para regeneración de tejidos

Los andamios para regeneración de tejidos deben asemejar la matriz extracelular, ya que esta es la responsable de la integridad de los tejidos. Los andamios deben de poseer estructuras en forma de una malla de micro o nanofibras que sirven para que las células se adhieran y se mantengan en la estructura porosa, poseen suficiente resistencia mecánica para soportar el tejido en él y debe participar en la regulación del comportamiento de las células alrededor del andamio. Entre las técnicas existentes para la fabricación de andamios que permiten imitar la estructura de la matriz extracelular encontramos: la liofilización, evaporación de disolventes, separación de fases, disolución de partículas, polimerización *in situ*, electrohilado, entre otras.

2.1.4. Electrohilado

La técnica de electrohilado se define como el proceso de producir fibras haciendo uso de un campo eléctrico, el cual actúa sobre las cargas inducidas en una solución polimérica. Este proceso posee distintas etapas, desde el bombeo de la solución polimérica al electrodo (aguja) hasta la etapa final de recolección de fibras. La primera etapa es la formación de la gota de polímero en la punta de la aguja como consecuencia del bombeo antes mencionado. Posteriormente, como resultado de la aplicación del campo eléctrico, la tensión superficial en la superficie de la gota comienza a ceder, dando como resultado la deformación de la gota hasta adquirir una forma cónica. A esta forma cónica se denomina comúnmente como el “cono de Taylor”, el cual es muy importante dado que de su correcta formación depende en gran parte la morfología final de las fibras (Shukor, Y., 2006).

Una vez alcanzado un cierto valor límite característico de cada solución, la tensión superficial es vencida por la fuerza ejercida por el campo eléctrico sobre las cargas en el polímero provocando una deformación en la superficie del cono de Taylor. Esta deformación evoluciona hasta generar un chorro de polímero, el cual no sigue una trayectoria en línea recta hacia el colector, sino que sufre una serie de inestabilidades electrodinámicas que lo hacen seguir una trayectoria en forma de círculos concéntricos hasta alcanzar el colector. Como resultado de la evaporación del solvente y de las inestabilidades antes mencionadas, el chorro de polímero sufre una disminución en su diámetro hasta llegar a alcanzar escalas nanométricas, una vez depositado en el colector. Inicialmente se creía que conforme avanzaba en su camino hacia el colector, el chorro principal de polímero se dividía en múltiples chorros más pequeños (Shukor, Y., 2006).

2.2. Biomateriales para regeneración ósea

2.2.1 Metales

Los materiales metálicos y sus aleaciones son los que poseen las más adecuadas propiedades mecánicas comparándolo con los otros tipos de biomateriales. Estas propiedades promueven que este tipo de materiales sean enfocados en aplicaciones estructurales, como por ejemplo: tornillos de fijación, implantes dentales, placas de osteosíntesis y prótesis estructurales. A pesar de esto, varios de ellos pueden presentar rechazo por el tejido, ya que presentan toxicidad celular por la liberación de iones metálicos. Sin embargo, las aleaciones metálicas son de las más empleadas por contener en su composición química moléculas o elementos que pueden evitar la oxidación del

metal, mejorando la tolerancia por el organismo hacia el material. El titanio por ejemplo, para mejorar sus propiedades mecánicas se le incorporan elementos de aleación de vanadio y aluminio (Bhat, S.V. 2002).

Los tejidos no pueden tolerar por un tiempo prolongado la presencia de metales (a excepción del titanio), debido a la corrosión que sufre el material en el sitio del implante, se producen productos de corrosión en las zonas circundantes del tejido (Bhat, S.V. 2002).

2.2.2. Cerámicos

La matriz ósea está formada fundamentalmente por materia orgánica (un 25%), materia inorgánica (60 - 70%) y agua (5 - 8%). La parte orgánica está constituida principalmente de colágeno tipo I (90%), y en menor proporción, por proteínas no colagénicas y factores bioquímicos locales. En el hueso se encuentran depósitos de minerales, fundamentalmente calcio y fosfatos. La fisiología del calcio es vital para la función muscular, contracción cardíaca, actividad neuronal, hemostasia y, en general, para la mayoría de los procesos de regulación transmembranal (Vallet-Regí, M. 2011).

Los biocerámicos son compuestos químicos complejos que contienen elementos metálicos y no metálicos. Debido a sus enlaces iónicos o covalentes, son generalmente, duros y frágiles. Además de tener un alto punto de fusión y una baja conductividad térmica y eléctrica, los cerámicos se consideran resistentes al desgaste. Los principales biocerámicos son alúmina, zirconia, hidroxiapatita, porcelanas, vidrios bioactivos, etcétera. Sus principales aplicaciones están en el sistema óseo, con todo tipo de implantes y recubrimientos en prótesis articulares; también se utilizan en aplicaciones

dentales, en válvulas artificiales, cirugía de la espina dorsal y reparaciones craneales (Vallet-Regí, M. 2011).

2.2.3. Polímeros

Actualmente existen numerosos polímeros utilizados en el campo biomédico. Algunos de ellos son estables, y son utilizados para aplicaciones permanentes, como el poli (metilmetacrilato) (PMMA), o el polietileno (PE). En los últimos años se han ido introduciendo los polímeros biodegradables (Figura 2), para aplicaciones temporales. Estos materiales tienen la capacidad de ser compatibles con el tejido y de degradarse cierto tiempo después de ser implantados dando lugar a productos que no son tóxicos y pueden ser eliminados por el organismo o metabolizados por éste. Generalmente, este grupo está representado por los polímeros biodegradables, aunque existen ciertos materiales cerámicos los cuales también son reabsorbibles.

Existen algunas características que deben presentar los materiales biodegradables para poder ser utilizados como implantes en el organismo humano, por ejemplo, los materiales y sus sub-productos no deben ser mutagénicos, carcinogénicos, antigénicos, tóxicos y, lógicamente deben ser antisépticos, esterilizables, compatibles con el tejido receptor, de fácil procesado y capaz de conformarse en distintas formas entre otros requisitos. Hoy en día, una gran parte de la investigación en el área de los polímeros para aplicaciones biomédicas se encuentra dirigido sobre todo al desarrollo de polímeros sintéticos.

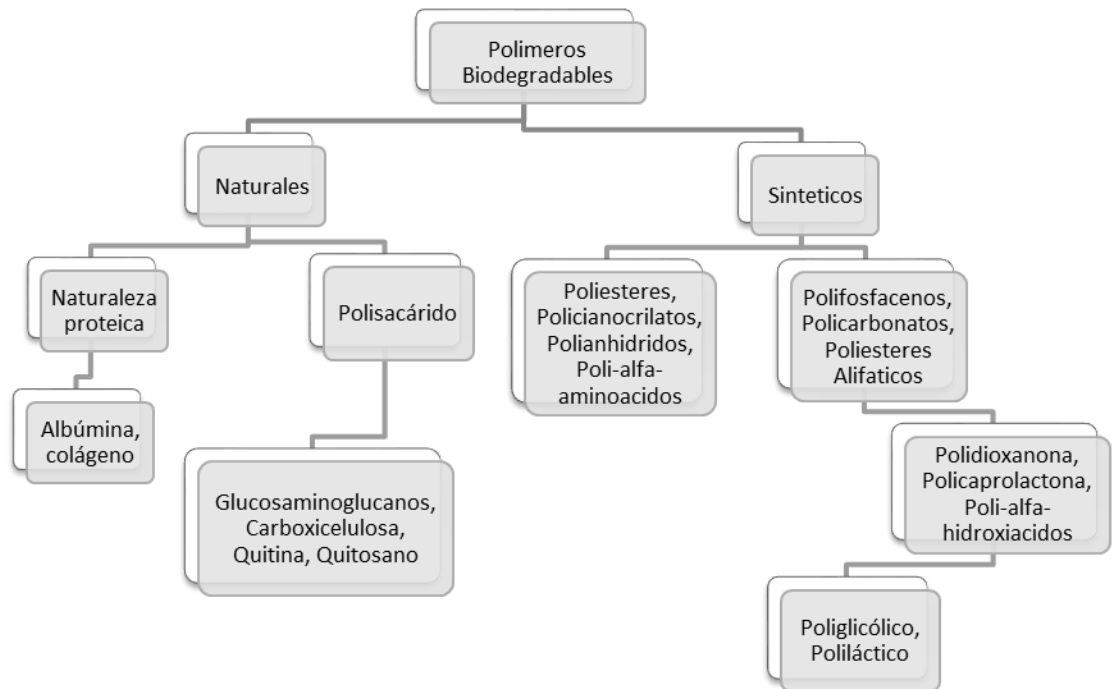


Figura 2. Polímeros Biodegradables utilizados en aplicaciones biomédicas.

2.2.4. Materiales compuestos

2.2.4.1. Hidroxiapatita

Entre los materiales cerámicos que se utilizan para regeneración ósea, la más importante es la hidroxiapatita (HA) y fosfatos de calcio en general, ya que se caracterizan por tener las siguientes propiedades: composición química muy parecida al hueso, propiedades mecánicas semejantes a huesos y propiedades osteoactivas (Velasco-Peñal, M.A. y Garzón-Alvarado, D.A. 2009).

La hidroxiapatita es un compuesto inorgánico mineral de fosfato de calcio cristalino $(Ca_{10})(PO_4)_6(OH)_2$. Este cerámico es el más usado para la regeneración de tejido óseo y dental, es el principal componente mineral de los huesos en mamíferos y constituyen entre el 60 y el 70 % del peso del tejido óseo seco (Figura 3) y entre 74% y 96% en

esmalte y dentina, respectivamente. En dependencia de su fuente puede presentar una estructura muy similar al tejido óseo, lo que provee características de osteoconductividad que permite que el tejido conectivo del hueso que le rodea le penetre y realice un proceso de osificación del material (Velasco-Peñal, M.A. y Garzón-Alvarado, D.A. 2009).

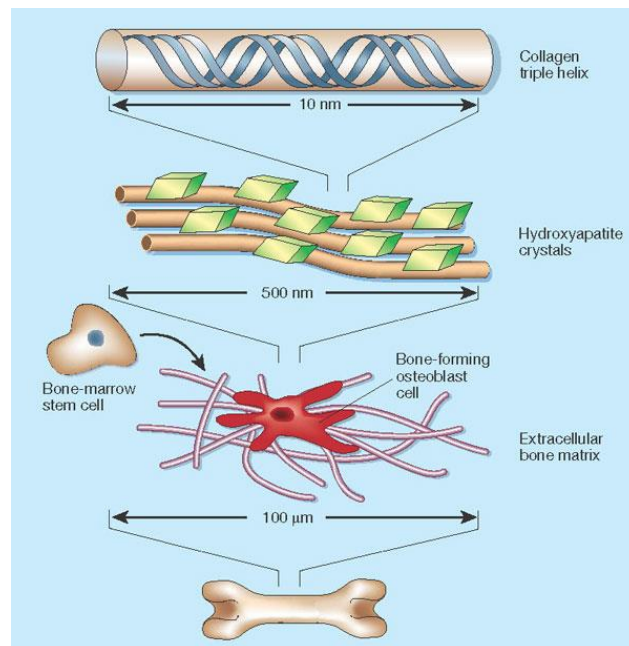


Figura 3. Los diferentes niveles de organización del hueso natural (Taton, T.A. 2001).

2.2.4.1.1. Eventos que suceden durante la interacción hidroxiapatita - célula

Los eventos que suceden al interactuar la hidroxiapatita con el tejido óseo durante el proceso de implantación y consolidación se describen en los siguientes puntos:

- Implantación de hidroxiapatita – macrófagos.
- Infiltración sitio quirúrgico.
- Fagocitosis residuos celulares.

- Ataque a la superficie de la hidroxiapatita.
 - Formación capa de apatita en la superficie del implante.
 - Osteoblastos: migración hacia el borde del defecto óseo.
 - Depósito de osteoides sobre superficie de hidroxiapatita.
 - Vascularización a través de los poros.
 - Formación de apatita biológica.

La hidroxiapatita es osteoconductiva a la que pueden añadirse proteínas morfogenéticas óseas o BMPs (por sus siglas en inglés) y tener también la capacidad osteoinductora, estos últimos son muy costosos y escasos en nuestro medio (Ferrer, Y. 2008).

Las indicaciones del bioimplante, como injerto de interposición y/o relleno, es decir, como apósito, su uso debe ser limitado pues es reabsorbido gran cantidad del biomaterial por los líquidos tisulares, al no estar toda su superficie en contacto con tejido óseo, las contraindicaciones de su utilización son en la sepsis del área quirúrgica, necrosis de la zona receptora, y las implantaciones intrarticulares, pues el líquido sinovial favorece la reabsorción del bioimplante (Ferrer, Y. 2008).

La biocompatibilidad de la hidroxiapatita sintética ha sido sugerida no solo por su composición sino por los resultados obtenidos en su implantación *in vivo*, los cuales han demostrado ausencia de toxicidad local o sistémica, no provocando inflamación o respuesta a cuerpo extraño (Delgado, R. et al. 2006).

Entre las desventajas de la hidroxiapatita se encuentran su débil resistencia mecánica y fragilidad, aunque altos niveles iniciales de resistencia pueden lograrse

controlando el grado de porosidad y el grosor del implante, ofreciendo la ventaja de una fijación biológica por crecimiento óseo dentro de los poros interconectados. La combinación de ésta, con alguna sustancia osteoinductora como las proteínas morfogenéticas óseas, mejoran sus características. La hidroxiapatita-200 ha demostrado ser un material biocompatible con una excelente integración al tejido óseo circundante (Ferrer, Y. 2008).

Por último, entre las aplicaciones de la hidroxiapatita y fosfatos de calcio aparte de su uso en la regeneración de tejido dental y óseo, podemos encontrar nanopartículas hechas por estos cerámicos para aplicaciones biomédicas, como materiales de implante óseo, como vectores para el liberado de ADN y SiARN (Motskin, M. et al. 2011).

2.2.4.2. Poli (L-láctico)

El ácido poli (L-láctico), PLLA, es un polímero termoplástico, amorfo o semicristalino, que ha sido ampliamente estudiado en aplicaciones como la liberación controlada de fármacos, suturas biodegradables y diferentes implantes para la fijación de fracturas y para la elaboración de dispositivos vasculares (Sánchez, C. and Molina, M.J. 2011).

2.2.4.2.1. Síntesis

La síntesis del ácido poli (L-láctico) generalmente se lleva a cabo, a partir de la polimerización por apertura de anillo del diéster cíclico (Figura 4). Diferentes compuestos metálicos, organometálicos e inorgánicos de Zinc y estaño han sido usados como iniciadores. Sin embargo, tetrafenil de estaño, cloruro estañoso y octato estañoso son los más efectivos (Sánchez, C. and Molina, M.J. 2011).

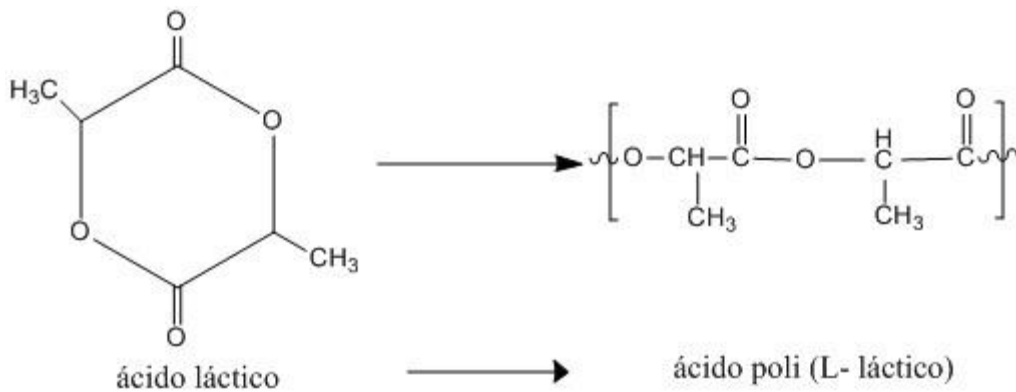


Figura 4. Síntesis del ácido poli (L-láctico)

2.2.4.2.2. Propiedades

Es un polímero que sustituye a los polímeros basados en hidrocarburos, forma parte de los hidroxiácidos, los cuales son moléculas precursoras del ácido poli (L-láctico), con un átomo de carbono asimétrico, esta molécula tiene cuatro formas estereoisoméricas: L, D, meso y mezcla racémica hecha de maíz, remolacha, trigo y otros granos ricos en almidón, desde el estado amorfo al cristalino por manipulación de mezclas de los isómeros D (-) y L (+). El ácido láctico se genera en los músculos humanos durante una actividad física, se forma por fermentación de carbohidratos como se muestra en la Tabla 2, en donde se señalan algunas de las propiedades fisicoquímicas del ácido poli (L-láctico). El ácido poli (L-láctico) tiene alto valor de fuerza mecánica, plasticidad térmica, y es manejable (Sánchez, C. and Molina, M.J. 2011).

Tabla 1. Algunas propiedades del PLLA en comparación con el acero y el hueso cortical.

Material	Temperatura de transición cristalina Tm (°C)	Temperatura de transición vítrea Tg (°C)	Módulo de Young E (GPa)	Tiempo de degradación (meses)
PLLA	173-178	60-65	2.7	>24
PDLLA	Amorfo	55-60	1.9	12-16
Hueso			10-20	
Acero			210	

2.2.4.2.3. Biocompatibilidad

Debido a que el ácido láctico es un intermediario común en el metabolismo de los carbohidratos en nuestro organismo, el uso de este hidroxácido es generalmente visto como la situación ideal desde el punto de vista toxicológico. Los poliésteres alfa, como el PLLA se degrada inicialmente por hidrólisis y su degradación puede ser acelerada *in vivo* por la presencia de enzimas, lo cual conlleva a la liberación de sus respectivos monómeros (ácido láctico en este caso). Estos monómeros son incorporados dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúa su degradación y da inicio a la ruta metabólica (Figura 5) (Sánchez, C. and Molina, M.J. 2011).

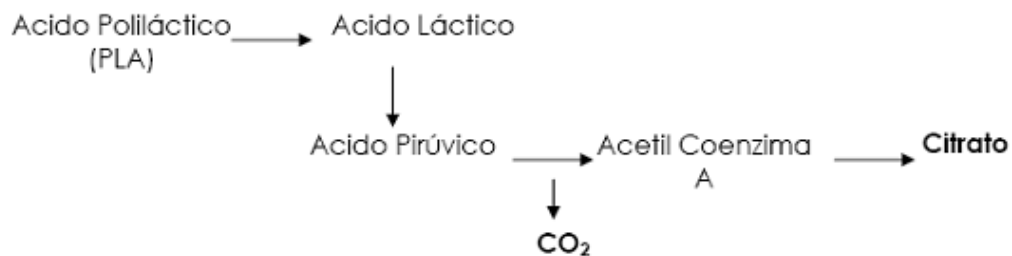


Figura 5. Esquema de degradación del PLLA en el organismo.

La ruta metabólica del ácido láctico comienza con la transformación de lactato a piruvato por la acción de la enzima lactato dehidrogenasa, una vez convertido en piruvato, éste sufre una decarboxilación oxidativa para producir Acetilcoenzima A. Esta molécula puede entrar en el ciclo del ácido tricarboxílico (o ciclo del ácido cítrico), el cual se lleva a cabo a nivel mitocondrial obteniéndose como resultado ATP por fosforilación oxidativa más agua y dióxido de carbono, los cuales son eliminados en la respiración y excretados por los riñones (Sánchez, C. and Molina, M.J. 2011).

2.2.4.2.4. Aplicaciones

El PLLA es actualmente utilizado en clavos para la unión de ligamentos y reparación de meniscos, suturas, tornillos y clavos para la fijación de fracturas y cirugía maxilofacial, liberación de fármacos y stents para cirugía cardiovascular (Sánchez, C. and Molina, M.J. 2011).

Una de las aplicaciones más recientes del PLLA es en el campo de la ingeniería de tejidos, la cual se basa en generar tejidos a partir de células del mismo paciente cuyo crecimiento es guiado *in situ* mediante andamios reabsorbibles. Este tipo de terapia ha sido estudiada para la regeneración de diferentes tejidos como lo son el tejido cutáneo, hepático, cardiovascular y más recientemente, el cartilaginoso y el tejido óseo. Hoy en día se encuentran en el mercado productos basados en ingeniería de tejidos para la reparación de tejido cutáneo. Otros tejidos como el óseo y el cartílago se encuentran todavía en fase de estudio (Sánchez, C. and Molina, M.J. 2011).

Tabla 2. Materiales para implantes óseos. Extraído y adaptado de Ikada, D.E. 2006.

Composición	Tipo	Origen	Aplicaciones Clínicas	Propiedades
Fosfatos de calcio Ej.: hidroxiapatita, fosfato tricálcico, fosfato de octacalcio	Cerámico	Sintético	Regeneración ósea, de sitios sin carga mecánica, relleno de defectos óseos (cementos, gránulos, recubrimientos)	Adhesión de tejido óseo (bioactividad), biodegradable, tasa de degradación variable
Fosfatos de calcio base silicio (biovidrios)	Vidrios cerámicos	Sintético	Regeneración ósea, de sitios sin carga mecánica, relleno de defectos óseos (gránulos, recubrimientos)	Adhesión de tejido óseo (bioactividad), biodegradable
Alumina (óxido de aluminio)	Cerámico	Sintético	Reemplazo de articulaciones (rodilla, hombro)	Alta resistencia a la tensión, resistencia a la fatiga, sin adhesión de tejido óseo, alta resistencia a la fatiga, baja fricción
Titanio y sus aleaciones	Metal	Sintético	Reemplazo de hueso en sitios con carga mecánica. Prótesis dentales o de cadera, vertebras	Adhesión de tejido óseo (bioactividad) en algunos casos. Resistente a la corrosión. Alta resistencia mecánica
Acero inoxidable, aleaciones de cobalto y cromo	Metal	Sintético	Reemplazo de hueso en sitios con carga mecánica, prótesis dentales y de cadera, vértebras y fijaciones	Corrosión a largo plazo
Polimetilmetacrilato	Polímero	Sintético	Reemplazo de hueso en zonas con carga mecánica, relleno de defectos óseos (cemento óseo). Fijación de prótesis de cadera y vertebroplastia	No degradable
Poliésteres como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico, policaprolactona y poliuretano.	Polímero	Sintético	Fijación degradable de hueso, hilo de sutura, relleno de defectos óseos, regeneración de tejido blando y liberación controlada de fármacos	La tasa de degradación y las propiedades mecánicas se pueden controlar variando su peso molecular
Poliétileno de ultra alto peso molecular	Polímero	Sintético	Componente de prótesis articulares en la zona de movimiento relativo (junta)	Capacidad de lubricación
Tereftalato de polietileno	Polímero	Sintético	Cemento y relleno de defectos óseos.	La tasa de degradación y las propiedades mecánicas se pueden controlar variando su peso molecular.
Poliétilenglicol	Polímero	Sintético	Excipiente en fármacos y alimentos. Reparación de tejidos duros y blandos	Bioactivo Gel acuoso inyectable y degradable
Coral	Mineral	Natural (animal)	Relleno de defectos óseos	Alta interconexión, biodegradable
Matriz ósea desmineralizada	Proteína	Natural (humano)	Relleno de defectos, regeneración de cartílago	Biodegradable, fuente natural de proteínas BMPs

2.2.4.3. Caracterización mecánica y biológica de los andamios de PLLAHA pura e injertada

Investigadores del Instituto de investigación en Materiales, de la UNAM, lograron desarrollar andamios de poli (L-lactida) con hidroxiapatita pura e injertada mediante la técnica de electrohilado con características deseables. Las propiedades tanto mecánicas como biológicas que obtuvieron son las adecuadas para aplicaciones en ingeniería de tejidos óseos. Para lograr esto, se injertó poli (L-lactida) en la superficie de nanopartículas de hidroxiapatita mediante polimerización *in situ* en presencia y ausencia de octoato de estaño. Se obtuvo evidencia que el octoato de estaño favorece la cantidad de injerto pero se descartó por su posible citotoxicidad (Vera-Graziano, R. et al. 2012).

La hidroxiapatita injertada promovió la formación de andamios con fibras poco defectuosas, esto provocó un aumento en la conductividad eléctrica, su porosidad fue la adecuada para permitir la proliferación celular, sin afectar significativamente las propiedades mecánicas de los materiales. Los andamios de poli (L-lactida) con 4% de hidroxiapatita injertada presentaron las propiedades mecánicas más adecuadas, tales como el módulo elástico, esfuerzo de cedencia, resistencia a la tensión y deformación. Este tipo de propiedades mecánicas hacen que estos andamios sean los ideales para la regeneración ósea. Estos investigadores también demostraron que los andamios con 4, 10 y 20 % de hidroxiapatita pura e injertada, poseen excelentes propiedades osteoconductoras (Vera-Graziano, R. et al. 2012).

Por último, los andamios de PLLAHAinj al 4, 10 y 20% presentaron una estructura y distribución de hidroxiapatita que influyen positivamente sobre la proliferación celular y diferenciación osteoblastica. Las células cultivadas sobre estos andamios, inducidos a la proliferación osteoblastica, presentaron una respuesta positiva en la maduración de osteoblastos y mineralización de la matriz extracelular (Vera-Graziano, R. et al. 2012).

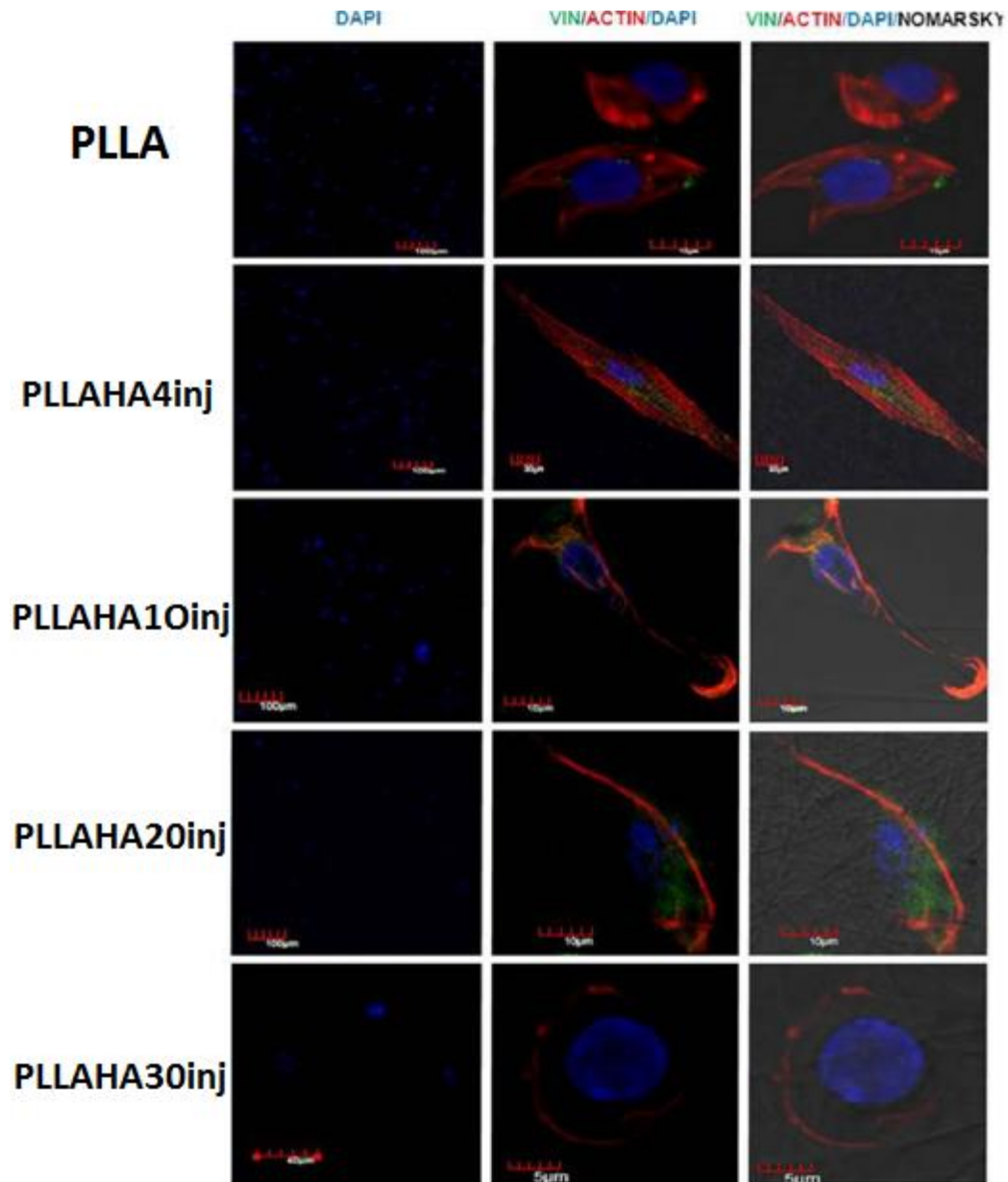


Figura 6. Ensayo de inmunofluorescencia donde se visualiza la vinculina de Células Madre Mesenquimiales cultivadas sobre andamios de PLLA, PLLAHA4inj, PLLAHA10inj, PLLAHA20inj y PLLAHA30inj. La columna de la izquierda solo se usó DAPI para teñir los núcleos, la columna central y derecha se visualizan los núcleos (azul), la actina (rojo) y la vinculina (verde) (Vera-Graziano, R. et al. 2012).

2.3. Evaluación de biocompatibilidad

2.3.1. Biocompatibilidad

La biocompatibilidad es la habilidad de un material para realizar sus funciones específicas en un sistema fisiológico con una apropiada respuesta del organismo. La biocompatibilidad también está definida en términos del desarrollo exitoso de una tarea específica del material. Por ejemplo, para un paciente que se siente bien con una prótesis vascular implantada constituida de Dacrón, muy pocas personas estarían en una posición en contra de que el dispositivo no es biocompatible. Sin embargo, la prótesis probablemente no se recelularizará (aunque haya sido diseñada para ese objetivo) y puede producir embolia, en este caso la embolia tiene poco impacto clínico. En este caso la definición operacional de biocompatibilidad es: “si el paciente está vivo el material es compatible”. Por este tipo de caso, el termino biocompatibilidad debe ser definido de manera específica dependiendo las aplicaciones en tejido blando, tejido duro y en el sistema cardiovascular (hemocompatibilidad). Por lo tanto, la biocompatibilidad debe está definida, para cada aplicación (Ratner, B.D. et al. 2004).

La pregunta importante en el estudio de la biocompatibilidad es como el dispositivo o material transduce su forma estructural y composicional para direccionar o influenciar la respuesta de las proteínas, células y el organismo (Ratner, B.D. et al. 2004).

2.3.1.1. Respuesta inmunológica a materiales implantados

2.3.1.1.1. Rol de las proteínas adsorbidas en la respuesta tisular a los biomateriales

En un periodo muy corto de tiempo (< 1 segundo), las proteínas pueden ser observadas en la superficie de los materiales. En segundos a minutos, una monocapa proteica se adsorbe en la mayoría de las superficies, la adsorción proteica es un evento previo antes de la migración celular hacia el material, las células no interaccionan con la superficie del material, sino con la monocapa proteica en la superficie del material, ya que las células responden específicamente a las proteínas, la monocapa proteica es el evento que controla la bioreacción subsecuente a los implantes, después de que las proteínas se adsorben, las células llegan a la superficie del implante por mecanismos difusivos, convectivos y activos.

Las células se pueden adherir, liberar componentes activos, reclutar otras células, crecer en tamaño, replicar y morir. Estos procesos ocurren frecuentemente en respuesta a las proteínas sobre la superficie del material. Los procesos celulares conllevan a respuestas (algunas deseables y otras no) fisiológicas después de ser implantado un material al organismo (Ratner, B.D. et al. 2004).

Después de que las células llegan e interactúan con la superficie implantada, ellas se diferencian, multiplican y comunican con otros tipos celulares y se organizan entre ellos en tejidos comprometidos a uno o diferentes tipos celulares. Las células secretan moléculas de la matriz extracelular que llenan los espacios entre las células y sirven de estructuras de adhesión entre proteínas y células. Los procesos de

angiogénesis (formación de vasos sanguíneos pequeños) y vasculogénesis (formación de vasos sanguíneos grandes) son críticos para proveer al nuevo tejido de nutrientes y remover desechos. Finalmente, los tejidos tienen reacciones distintivas a la irritación y a la lesión (Ratner, B.D. et al. 2004).

2.3.1.1.2. Las células y tejidos responden a fuerzas mecánicas

Dos muestras hechas del mismo material, uno con forma triangular y otra en forma de disco, implantados en tejido suave, mostraran diferentes reacciones de regeneración tisular con considerable mayor reacción fibrosa en las puntas de la forma triangular que en la circunferencia del círculo (Ratner, B.D. et al. 2004).

Las células sanguíneas y el linaje endotelial muestran diferentes ambientes de respuesta dependiendo a que estén expuestos si a fuerzas intensas o leves.

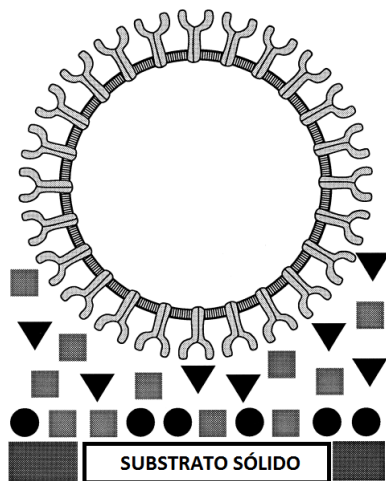


Figura 7. Las interacciones celulares con superficies extrañas son mediadas por receptores de integrinas con proteínas de adhesión adsorbidas en la superficie del material. Usualmente las proteínas adsorbidas en la superficie del material cambian su actividad biológica cuando son adsorbidas (Ratner, B.D. et al. 2004).

2.3.1.1.3. Inflamación granulomatosa

Los neutrófilos eliminan habitualmente a los agentes que inducen una respuesta inflamatoria aguda. Sin embargo, en algunos casos los neutrófilos no pueden digerir a

las sustancias que provocan la reacción inflamatoria aguda, una situación potencialmente peligrosa, pues puede desencadenar un círculo vicioso de:

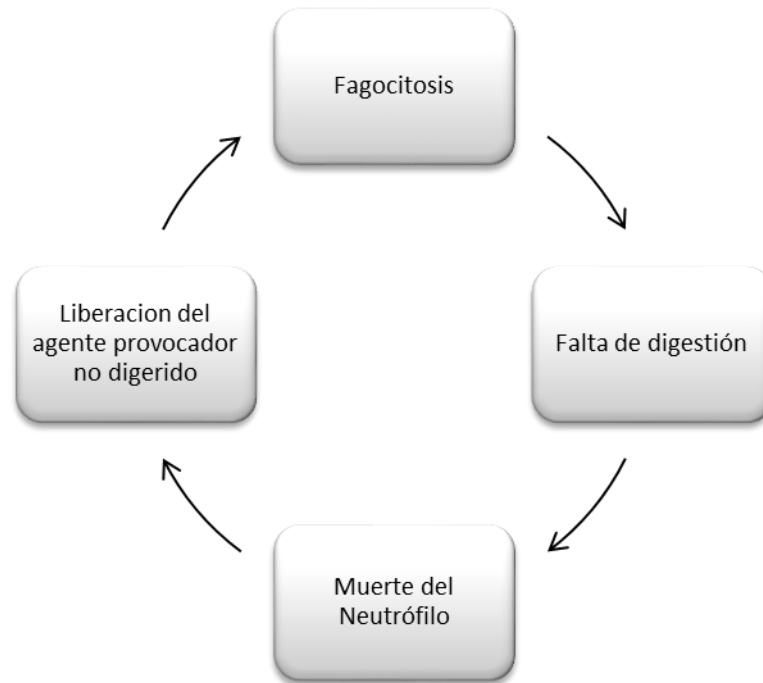


Figura 8. Ciclo de incapacidad de digestión del cuerpo extraño.

Una vez que se libera el material nocivo, puede ser fagocitado de nuevo por otro neutrófilo recién incorporado, con repetición de la secuencia. El resultado será una inflamación aguda destructiva y persistente. Sin embargo, el organismo dispone de un mecanismo para enfrentarse a las sustancias no digeribles, la inflamación granulomatosa (Rubin, et al. 2006).

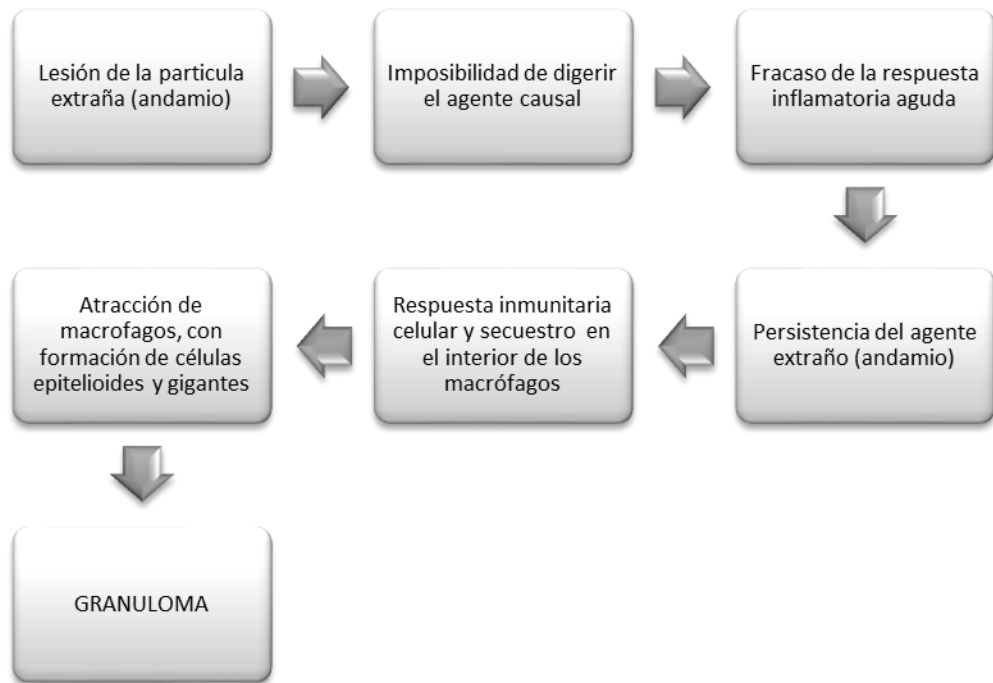


Figura 9. Proceso de formación del granuloma.

Las principales células que intervienen en la inflamación granulomatosa son los macrófagos y los linfocitos. Los macrófagos tienen una vida mucho más larga que los neutrófilos y, si el agente extraño no los destruye, pueden quedar secuestrados en el citoplasma del macrófago durante un tiempo indefinido, lo que evitará que continúen provocando la reacción inflamatoria aguda. Los macrófagos son células móviles que emigran continuamente por los tejidos conjuntivos extravasculares del organismo. Su atracción hacia los focos de lesión y su activación están reguladas por la producción local de factores quimio tácticos y citosinas secretadas por los linfocitos T activados. Varias citosinas estimulan la función de los macrófagos (TNF γ), mientras que otras inhiben su activación (IL-4, IL-10). Por lo tanto, los linfocitos son esenciales para la regulación del desarrollo y la resolución de las respuestas inflamatorias. Cuando se acumulan sustancias que no pueden digerir, los macrófagos pierden su movilidad y se

acumulan en el foco de la lesión, donde sufren una modificación característica en su estructura que los transforma en células epitelioides. Los acúmulos de estas células epitelioides constituyen los “granulomas”, que son la clave morfológica de la inflamación granulomatosa (Rubin, et al. 2006).

Los granulomas son pequeñas agrupaciones (<2mm) de células epitelioides y de células gigantes multinucleadas (a menudo rodeadas de una corona de linfocitos) que se forman por la fusión de los citoplasmas de los macrófagos (Rubin, et al. 2006).

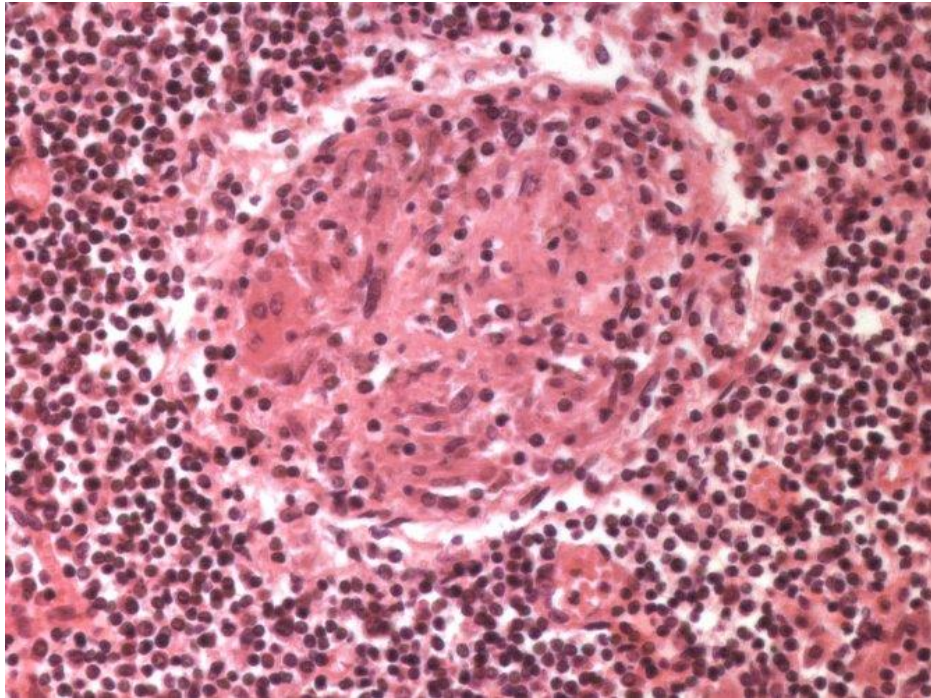


Figura 10. Micrografía que presente diferentes granulomas. Tomado de http://www.pathguy.com/~egarcia/histoplasmosis_granuloma.htm

Cuando los núcleos de los macrófagos se disponen alrededor de la periferia de la célula con un patrón en herradura, la célula se denomina célula gigante de Langhans (Figura 11).

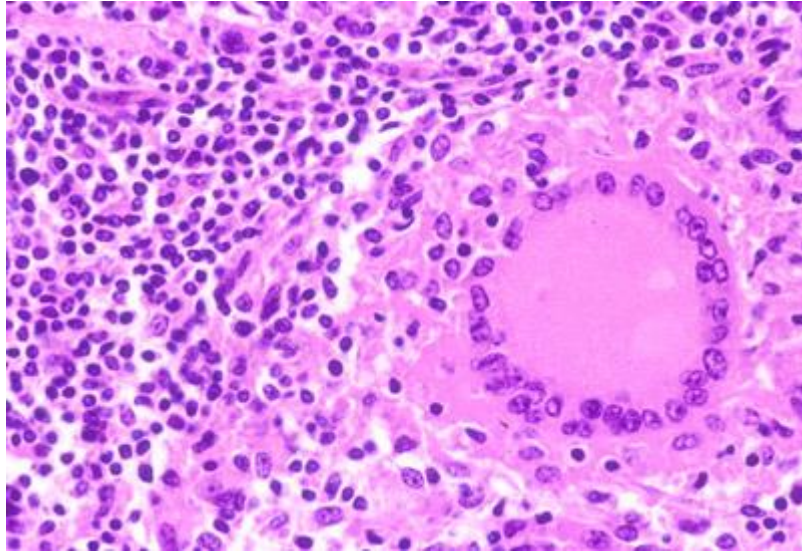


Figura 11. Micrografía que presenta células gigantes multinucleadas. Tomado de http://www3.unileon.es/personal/wwdmavpp/hp_iv_inflamacion_ii_%20e_inmunohistoquimica.htm

En los granulomas, pueden encontrarse cualquiera de los demás tipos de células características de la inflamación crónica, es decir, linfocitos, eosinófilos y fibroblastos (Rubin, et al. 2006).

Pese a la larga vida de los macrófagos de las reacciones granulomatosas, estas células experimentan recambio, aunque de forma muy lenta. Tras la muerte del macrófago, el agente nocivo no digerible queda libre y puede seguir provocando una reacción inflamatoria aguda. Por lo tanto, en muchas reacciones granulomatosas se encuentran cantidades variables de polimorfonucleares (PMN). El recambio de las células epitelioides depende también de la toxicidad del agente causal, de forma que cuanto más inerte sea, más lento será el recambio celular. La evolución de la reacción granulomatosa no solo depende de la citotoxicidad del agente causal, sino también de su capacidad inmunógena. Los agentes nocivos que se liberan lentamente a partir de los macrófagos y las células epitelioides pueden desencadenar un fenómeno de sensibilidad

inmunitaria. En concreto, las respuestas de tipo celular a estos agentes pueden modificar la reacción granulomatosa, atrayendo y activando a nuevos macrófagos y linfocitos (Rubin, et al. 2006).

2.4. Ensayos para evaluación de la biocompatibilidad

La evaluación de biocompatibilidad de los materiales va a depender de la aplicación de este último, sin embargo, existen condiciones generales que se aplican a todos los materiales (Ratner, B.D. et al. 2004).

2.4.1. Ensayos *in vitro*

La evaluación *in vitro* ofrece datos de interacciones biológicas de una manera rápida y económica. Sin embargo, las preguntas deben de hacerse de tal manera que determinen si el ensayo *in vitro* será capaz de medir parámetros importantes que evidencien que ocurriría en un sistema mucho más complejo en un ambiente *in vivo*. Por ejemplo, el poli estireno utilizado en las cajas petri o frascos para cultivo de tejidos, el cual tiene una superficie modificada en el poli estireno, las células tendrán adherencia y crecerán en el cultivo. El poli estireno sin tratar, no servirá como superficie óptima para que las células se adhieran y por lo tanto no crecen y mueren las células de mamífero. Sin embargo, cuando el poli estireno es implantado *in vivo*, en ambos casos tratado y sin tratar, el resultado es casi indistinguible y ambos provocaron cápsulas de cuerpo extraño o granuloma. Por lo tanto, los resultados del ensayo *in vitro* no proveen información relevante a la situación del implante (Ratner, B.D. et al. 2004).

Los ensayos *in vitro* minimizan el uso de animales para investigación, una meta deseable. También, las pruebas *in vitro* son requeridas para la mayoría de las agencias

regulatorias en los dispositivos en proceso de aprobación para aplicaciones clínicas. Cuando los ensayos *in vitro* son utilizados apropiadamente, estos protocolos proveen evidencias útiles que pueden dictaminar si un dispositivo o material será evaluado en modelos experimentales animales (Ratner, B.D. et al. 2004).

2.4.2. Ensayos *in vivo*

Los animales pueden ser utilizados para evaluar biomateriales con el propósito de modelar un ambiente parecido al de los humanos. Hay una gran cantidad de diversos modelos animales experimentales, que diversifican la anatomía, fisiología y bioquímica del animal. A pesar de que los modelos animales proveen de un ambiente fisiológico vivo, es difícil relacionar los efectos que el material o dispositivo implantado tendría en los humanos. El primer paso es diseñar procedimiento de ensayos en animales y escoger modelos que ofrecen situaciones bioquímicas y anatómicas razonablemente paralelas al cuerpo humano (Ratner, B.D. et al. 2004).

Es obligatorio minimizar el número de animales y asegurar que los animales sean tratados lo más humanamente posible (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8va edición, 2011) y maximizar la información relevante generada en el desarrollo de los ensayos es esencial.

Con algunos biomateriales es posible demostrar su funcionalidad en segundos y otros son implantados por periodos muy prolongados (10 a 70 años). Ratner, B.D. et al. 2004, se hace el cuestionamiento si 6 meses de implantación son útiles para visualizar si un dispositivo que se tiene pensado que este implantado por 3 minutos es biocompatible o por otro lado, si 6 meses de implantación son útiles para visualizar si un

dispositivo que se tiene pensado que este implantado para toda la vida es funcional, ellos concluyen que estas preguntas son difíciles de contestar. Por último, es importante tener en cuenta que la variabilidad de los resultados en sistemas biológicos siempre es un factor que estará presente a la hora de desarrollar los ensayos *in vivo*, es por eso, que es importante el uso de protocolos estadísticos que nos ayuden a responder situación que pueden ser relevantes en las conclusiones posteriores (Ratner, B.D. et al. 2004).

MATRIZ DE PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD

Programa de Evaluaciones específicas de Biocompatibilidad siguiendo la guía de la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) (1ero de Mayo de 1995) y los estándares ISO 10993. La Tabla está basada sobre la ISO 10993-1. Evaluation and testing. 3rd Edition 8/01/03.

CATEGORIAS DE DISPOSITIVOS		EFECTO BIOLOGICO												
Duración del contacto A= Limitada (≤24 horas) B= Prolongada (24 horas – 30 días) C= Permanente (>30 días)	Contacto Corporal	Citotoxicidad	Sensibilización	Irritación/Intercutánea	Toxicidad aguda sistémica	Toxicidad subcrónica	Genotoxicidad	Implantación	Hemocompatibilidad	Toxicidad crónica	Carcinogenicidad	Reproducción/Desarrollo	Biodegradación	
		Dispositivos de superficie	Piel	A	X	X	X							
B	X			X	X									
C	X			X	X									
Membranas mucosas	A		X	X	X									
	B		X	X	X	O	O		O					
	C		X	X	X	O	X	X	O		O			
Superficies comprometidas	A		X	X	X	O								
	B		X	X	X	O	O		O					
	C		X	X	X	O	X	X	O		O			
Dispositivos de comunicación externa	Circulación Sanguínea, Indirecta	A	X	X	X	X				X				
		B	X	X	X	X	O			X				
		C	X	X	O	X	X	X	O	X	X	X		
	Comunicación ¹ Tejido/Hueso/Dentina	A	X	X	X	O								
		B	X	X	X	X	X	X	X					
		C	X	X	X	X	X	X	X		X	X		
	Circulación Sanguínea	A	X	X	X	X		O ²		X				
		B	X	X	X	X	X	X	X	X				
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Dispositivos Implantables	Tejido/ Hueso	A	X	X	X	O								
		B	X	X	X	X	X	X	X					
		C	X	X	X	X	X	X	X		X	X		
	Sangre	A	X	X	X	X	X		X	X				
		B	X	X	X	X	X	X	X	X				
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		

X= Pruebas de ISO 10993-1
O= Pruebas adicionales que pueden ser aplicadas en los Estados Unidos
Nota 1: Incluye fluidos tisulares y espacios subcutáneos
Nota 2: Para todos los dispositivos usados en circuitos extracorpóreos

Figura 12. Matriz de evaluación de Biocompatibilidad ISO 10993-1. Esta Tabla indica los ensayos de biocompatibilidad y el tiempo de evaluación, dependiendo del tipo de material que entra en contacto al cuerpo humano (North American Science Associates, Inc. 2008. Federal Drug Administration, FDA guidance, 1995).

III. JUSTIFICACIÓN

Existe una necesidad de órganos y tejidos que es necesaria subsanar con alternativas más viables que la donación y el trasplante, entre estas alternativas se encuentran el uso de células y materiales de diversa naturaleza para la reconstrucción o regeneración de órganos y tejidos, estas vías alternativas son desarrolladas por la disciplina que hoy conocemos como ingeniería de tejidos.

La ingeniería de tejidos se define como un conjunto de técnicas avanzadas cuyo objetivo es el conseguir el crecimiento de determinadas células animales o humanas hasta dar lugar a tejidos completos capaces de ser implantados en el cuerpo humano o bien hacerlas crecer en el propio cuerpo humano para regenerar el tejido u órgano (Duque, J.P. 2010).

La ingeniería de tejidos ofrece la oportunidad de ayudar a la regeneración de tejido afectado por una enfermedad, síndrome o lesión y, en algunas ocasiones, crear nuevo tejido con la finalidad de reemplazar órganos con deficiencias funcionales (Stevens, M.M. 2008). Esto se puede conseguir con el uso de materiales bioactivos y biodegradables que inducen la proliferación celular (Avérous, L. 2008). Este tipo de biomateriales al ser procesados se pueden obtener andamios o soportes temporales de células transplantadas.

Ya que los andamios para regeneración de tejido deben de cumplir con ciertas características en particular, deben de considerarse diferentes factores, esto conlleva a

la importancia de elegir el material adecuado para cada aplicación, ya que las propiedades intrínsecas del material seleccionado determinará las propiedades tanto mecánicas como biológicas del andamio. Por otro lado, el método de síntesis del andamio afectará las propiedades del material: como el tipo y grado de porosidad, degradabilidad, propiedades mecánicas, características superficiales y por último, la biocompatibilidad (Hench, L.L. and Jones, J.R. 2005).

Por todo lo anterior, es importante la creación de andamios que asemejen la matriz extracelular, para así facilitar la regeneración de tejido, estos andamios aparte de tener propiedades mecánicas adecuadas, es indispensable que sean biocompatibles. El objetivo de este proyecto es evaluar que tan biocompatibles son los andamios de poli (L-lactida) con hidroxiapatita pura e injertada con varias concentraciones de refuerzo en tejido muscular y subcutáneo, para así llevarlos a la aplicación de regeneración de tejido duro.

IV. HIPÓTESIS

Los andamios electrohilados de poli (L-Lactida) con hidroxiapatita pura e injertada son biocompatibles al ser implantados en tejido vivo de la rata.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la Biocompatibilidad “*in vivo*” e “*in vitro*” de andamios electrohilados de poli (L-lactida) con hidroxiapatita pura e injertada para la regeneración de tejido duro.

5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la viabilidad celular bacteriana de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en presencia de los andamios PLLAHA y PLLAHAinj mediante pruebas de adhesión bacteriana y difusión en disco.
2. Evaluar la citotoxicidad en células de músculo de mioblasto de ratón C2C12 (ATCC® CRL-1772™) y células de Arteria Coronaria de Bovino (BCAEC) a través de los ensayos MTT y Rojo Neutro.
3. Evaluar la biocompatibilidad con los tejidos de rata Wistar mediante la prueba de sensibilización cutánea y la prueba de implantación.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Reactivos biológicos y químicos

Cloroformo: Para anestésiar a los animales y realizar la eutanasia.

DERMOQRIT (cloruro de benzalconio) Marca Degasa. Cada 100 mL contienen: 12 gr de cloruro de benzalconio, 5 gr de nitrito de sodio (antioxidante) y 100 mL.

Formaldehido 10% amortiguado: Formol al 10% pH 7.2- 7.4; el cual contiene 100 mL formol a 37°C, 4 gr fosfato de sodio monobásico monohidratado, 6.5 gr de fosfato de sodio dibásico anhidro y aforado a 1L en H₂O destilada.

Hematoxilina-Eosina: La hematoxilina, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura (núcleos celulares); y el uso de eosina que tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma.

Medio de cultivo LB: Para el crecimiento de las cepas *E. coli* y *S. aureus*. Contiene 10 gr de triptona, 10 gr de NaCl y 5 gr de extracto de levadura en un litro de agua bidestilada.

Parafina: Para hacer posible la reducción del tejido a cortes lo suficientemente delgados como para permitir el paso de la luz para examinarlo al microscopio.

Medio DMEM. Para el crecimiento celular de las líneas celulares C2C12 y BCAEC.

Tripsina-EDTA. Para la disociación y transferencia de los cultivos celulares de un contenedor a otro, así como la neutralización del efecto causado del suero fetal bovino.

Reactivo MTT. Para la evaluación de la función mitocondrial evidenciando la actividad reductora de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en las líneas celulares.

Colorante Rojo Neutro. Para la evaluación de la actividad endocítica a través de la fagocitosis del colorante rojo neutro por las líneas celulares expuestas a los materiales.

6.2. Equipo

Campana de seguridad Biológica híbrida tipo II marca Lumistell. Con el fin de esterilizar los andamios de PLLAHA y PLLAHAinj.

Microscopio Nikon Modelo Eclipse E 200, con oculares 10x, 40X, 100X y 400X y cámara Sony modelo Cyber-shot de 10.1 megapíxeles. Para tomar micrografías de las extracciones y frotis histológicos.

Espectrofotómetro UV/VIS DU730 marca Beckman Coulter: Obtener absorbencia que está relacionada a la concentración celular presente en la muestra.

Balanza analítica especial: Para el registro del peso de las ratas Wistar.

Micrótopo: Instrumento de gran precisión que nos proporcionan cortes delgados parejos y de espesor graduable. Los cortes más comunes son los de 4-6 micrones.

Lector de microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific): Obtener las absorbancias resultantes en los ensayos de viabilidad celular.

6.3. Protocolos generales

Tabla 3. Resumen de Ensayos *In vitro* e *In vivo* que se llevarán a cabo para evaluar la biocompatibilidad de los andamios de poli (L-lactida) con hidroxiapatita pura e injertada.

Ensayos <i>in vitro</i>	<i>In</i>	Línea celular	Institución donde se realizó	Preguntas involucradas	Justificación	Referencia
Número y crecimiento celular	<i>y</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	CITEC (Lab. Bioingeniería)	Los andamios PLLAHA y PLLAHAinj permiten la absorción celular y el crecimiento bacteriano?	Con el propósito de evaluar si los andamios PLLAHA y PLLAHAinj pueden alojar microorganismos	Nair, M.B., et al. 2006.
Reducción MTT		Células C2C12 y BCAEC	FPyM (Lab 3)	Los andamios PLLAHA y PLLAHAinj inhiben el crecimiento celular?	Con el propósito de evaluar si los andamios PLLAHA y PLLAHAinj provocan alteraciones en la función mitocondrial de las células	Takamori, E.R. et al. 2007
Incorporación de rojo neutro		Células C2C12 y BCAEC	FPyM (Lab 3)	Los andamios PLLAHA y PLLAHAinj inhiben el crecimiento celular?	Con el propósito de evaluar si los andamios PLLAHA y PLLAHAinj provocan alteraciones en el proceso de endocitosis de las células	Takamori, E.R. et al. 2007
Ensayos <i>in vivo</i>	<i>In</i>	Línea animal	Institución donde se realizó	Preguntas involucradas	Justificación	Referencia
Prueba de sensibilización cutánea		Ratas Wistar	FPyM (Zooterio)	Los andamios PLLAHA y PLLAHAinj son irritantes a la piel?	Con el propósito de evaluar si los andamios PLLAHA y PLLAHAinj provocan hipersensibilidad cutánea	Jackson, L.R. and Fox, J.G. 1995.
Prueba de Implantación		Ratas Wistar	FPyM (Zooterio)	Los andamios PLLAHA y PLLAHAinj causan algún efecto adverso al ser implantado?	Con el propósito de evaluar si los andamios PLLAHA y PLLAHAinj provocan efectos dañinos al tejido adyacente al lugar de implantación	Zar, J.H. 1999.

6.4. Cultivo celular

Para ambos ensayos se cultivaron células de músculo de mioblasto de ratón C2C12 (ATCC® CRL-1772™) y células de Arteria Coronaria de Bovino (BCAEC), las cuales son células primarias, ambas líneas celulares fueron donadas por el Dr. Francisco Villarreal, investigador de la UCSD School of Medicine, San Diego, California, USA. Ambas células fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) con rojo fenol y 10 % de Suero Fetal Bovino, en condiciones de esterilidad e incubadas a 37°C, con 5% CO₂. El medio de cultivo se cambió cada tercer día utilizando tripsina-EDTA, y fueron cultivadas hasta llegar al 100% de confluencia celular. Las células se cultivaron en 15 mL de (DMEM, Dulbecco's Modified Tagle Médium, Gibco) sin rojo fenol, suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de piruvato y un 1% de L-glutamina, Hepes 10 mM y NaHCO₃. Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora bajo una atmósfera con 5% CO₂. Las monocapas celulares se lavaron con una solución salina tamponada SBF (solución búfer fosfatos) y se tripsinizaron con tripsina-EDTA (ácido tetraacético etilen-dinitrilo) durante cinco minutos a 37°C para separarlas de la placa. Luego se añadió medio completo para neutralizar la reacción de tripsinización. Las células se concentraron mediante centrifugación para eliminar así la tripsina y luego se añadió nuevo medio. Se resuspendieron las células y se contabilizaron por medio de un hematocitómetro. Finalmente, se realizaron las diluciones necesarias a partir de las células totales para obtener la cantidad de células por pozo deseada (Norma española UNE-EN ISO 10993-5, Nalge Nunc International Corp.).

6.5. Número y crecimiento celular

Para evaluar el crecimiento o número celular, los andamios de PLLAHA y PLLAHAinj se colocaron en contacto directo sobre cultivos celulares bacterianos. Si el material no es citotóxico, las células permanecerían en contacto con el material y continuarían creciendo normalmente, por otra parte si el material es citotóxico, el crecimiento celular se detendrá y se observará un halo de inhibición alrededor del material. La densidad celular puede ser descrita de forma: cualitativa, semi-cualitativa, o cuantitativamente (Figura 13). El Teflón® fue utilizado como control negativo ya que es un material inerte, por otra parte el cloruro de poli (vinilo) plastificado fue utilizado como control positivo ya que es un material altamente citotóxico. Estas pruebas fueron utilizadas para medir la capacidad antimicrobiana de los materiales de PLLAHA y PLLAHAinj sobre microorganismos residentes de la cavidad oral como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los materiales con una elevada capacidad antibacteriana, frecuentemente inducen efectos adversos severos durante y después del tratamiento endodóntico, además de ser citotóxicos y mutagénicos (Nair, M.B., et al. 2006).

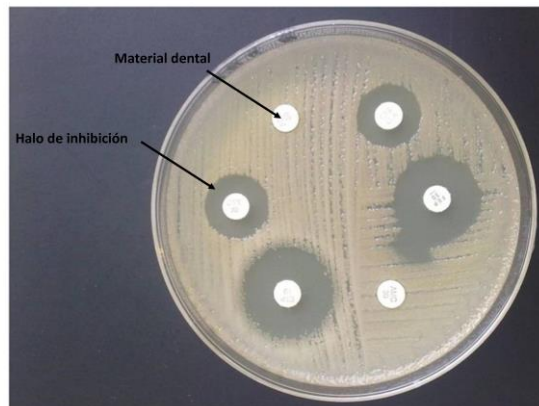


Figura 13. Prueba de crecimiento celular.

6.6. Ensayos de Viabilidad celular: MTT e incorporación de rojo neutro

6.6.1. Fundamento de la Reducción de MTT.

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa siendo un compuesto coloreado de color azul (formazán) (Figura 14), el cual permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Takamori, E.R. et al. 2007).

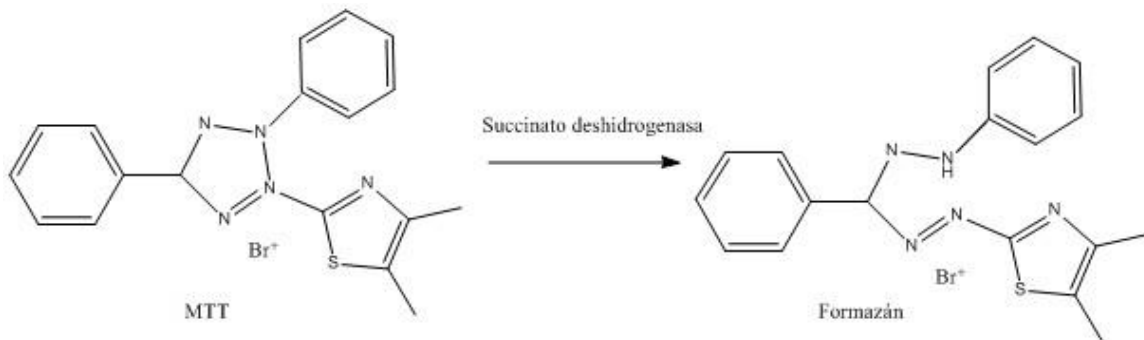


Figura 14. Reacción de reducción de MTT a formazán.

6.6.2. Fundamento de la Incorporación de Rojo Neutro (NR).

Esta prueba es una medida de la toxicidad de un compuesto a corto o largo término, determinado por la liberación de un colorante (rojo neutro) debido a la pérdida de la viabilidad celular. El rojo neutro es captado por las células (específicamente por los lisosomas y endosomas) y en la medida que la célula pierda viabilidad por la acción del compuesto que se evalúa se libera al medio el colorante pues solo las células viables son capaces de retener el colorante en su interior. Seguidamente se determinó la cantidad

de rojo neutro que permanece después de la exposición dentro de la célula y calculada la concentración que produce la inhibición del 50 % del crecimiento celular (Takamori, E.R. et al. 2007).

6.6.3. Metodología para los ensayos de viabilidad celular MTT e incorporación de rojo neutro.

Para ambos ensayos las dos líneas celulares se llevaron al 100% de confluencia en frascos T75 y se tripsinizaron para ser contados y ser llevados a un volumen final de 20 mL de medio DMEM con suero. Las células fueron contadas con la ayuda de un hematocitometro (Cole-Parmer).

Para el ensayo MTT las dos líneas celulares fueron sembradas con 100 μ L de la suspensión celular en los pozos que contenían en el fondo los materiales cortados circularmente con un diámetro de 0.5 cm, las cuales cubrieron toda la superficie del pozo, las 8 variantes de los materiales fueron colocados por triplicado en la misma columna para los dos ensayos, así mismo se sembraron las células en pozos que no contenían ningún material para ser usados como control negativo o SC (-) y el cual representaron el crecimiento normal celular, de igual forma, se utilizaron por triplicado solo la suspensión celular tanto para el ensayo MTT como para el ensayo rojo neutro. Las células se incubaron por 24 horas, 37°C y 5% CO₂. Al transcurrir las 24 horas, se añadieron 10 μ L del reactivo MTT y 10 μ L del colorante rojo neutro, se mezclaron bien y se incubaron por 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente se colocaron 100 μ L de dimetil sulfóxido en cada pozo, se mezclaron bien por pipeteo y se incubaron por 15 minutos a 37°C y 5% CO₂. Finalmente, todas las mezclas fueron extraídas y colocadas en

una caja nueva estéril de 96 pozos y se llevaron a leer en un lector de microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 570 nm para el ensayo MTT y 540 nm para el ensayo rojo neutro, respectivamente.

6.6.4. Análisis estadístico de los resultados de los ensayos de viabilidad celular

Las absorbancias obtenidas fueron promediadas, ya que se hicieron por triplicado y se realizaron gráficas de barras, enfatizando líneas con un porcentaje de error al 5%. Así mismo, se realizó el análisis de ANOVA de un solo factor, para observar si existe alguna diferencia significativa entre las muestras y el control. Las absorbancias de las muestras y el control fueron corregidas restando la absorbancia obtenida de los pozos que contenían solo el medio de cultivo con los reactivos MTT y rojo neutro, respectivamente.

6.7. Animales de experimentación

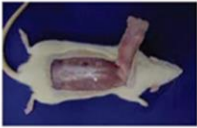

Para los animales de experimentación se utilizaron ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) utilizadas inicialmente para estudiar los efectos de la dieta y otros temas de fisiología. Debido a su velocidad de reproducción, a su facilidad de manejo y a muchas de sus similitudes fisiológicas con el ser humano, la rata albina ha venido utilizándose desde hace muchos años como sujeto de experimentos en los laboratorios de ciencias biológicas: con ellas suelen ponerse a prueba los medicamentos que luego se aplican como tratamiento de enfermedades humanas, con ellas se llevan a cabo numerosos experimentos relacionados con la genética, con el sueño y con muchos otros temas de la salud. También han resultado muy útiles en los estudios psicológicos acerca del aprendizaje y otros procesos mentales. Para este proyecto se decidió utilizar estos

modelos animales experimentales por su fácil manejo, reproducibilidad de los resultados, por ser económicos y por ser aceptados por las normas bioéticas para los ensayos de biocompatibilidad.

6.7.1. Creación de grupos de estudio

Para el ensayo de sensibilización cutánea se utilizaron un total de 14 ratas macho (164 gr a 236gr) y se dividieron en tres grupos que corresponden al día de desafío (sacrificio) para la toma de muestra histológica, cada grupo está constituido por 4 ratas, a tres de ellas se les implantó los andamios PLLAHA y PLLAHAinj y a la cuarta se le implantó gasa estéril (control positivo), el primer grupo se nombró SC5, las letras “SC” representa el tipo de ensayo “Sensibilización Cutánea” y “5” simboliza los días posteriores a la implantación del material, por lo que los tres grupos se nombraron como SC5, SC33 y SC99 y se desafiaron para su estudio histológico después de la implantación del material en 5, 33 y 99 días, respectivamente. Para el ensayo de Implantación se utilizaron 8 ratas para la implantación y 2 controles obteniendo un total de 10 ratas, estos se dividieron en dos grupos por tiempo de desafío, el primer grupo llamado Grupo I47, se sacrificaron a los 47 días después de la implantación y el Grupo I96 a los 96 días después del procedimiento quirúrgico (Tabla 4). Para los dos ensayos se utilizaron un total de 24 ratas, una cantidad aceptable por el comité de Bioética de la Facultad de Psicología y Medicina de la Universidad Autónoma de Baja California.

Tabla 4. Grupos de estudio Ensayo de Sensibilidad cutánea (4 ratas por grupo: 3 muestras y un control) y Grupos de estudio Ensayo de Implantación (4 ratas por grupo).

ENSAYOS	Grupo	Peso de las ratas (gr)	Tiempos de Toma de Muestra	No. De Rata	No. De Ratas (Total)
Prueba de sensibilización cutánea (SC) Zona de Implante (dorso) 	Grupo SC5	300-350	5 días (2 variantes de material por rata)	5	15
	Grupo SC33		33 días (2 variantes de material por rata)	5	
	Grupo SC99		99 días (2 variantes de material por rata)	5	
Prueba de Implantación (I) Zona de Implante (Pierna del <i>Biceps Femoris</i>) 	Grupo I47	300-350	47 días (2 variantes de material por rata)	5	10
	Grupo I96		96 días (2 variantes de material por rata)	5	
Total					25 ratas

6.7.1.1. Lectura de peso de las ratas Wistar

La lectura del peso en gramos de las ratas se llevó a cabo en una balanza analítica especial, los pesos de las 14 ratas fueron registrados y colocados en cajas individuales.

6.7.1.2. Cuidados antisépticos

Se tuvieron los siguientes cuidados para la prueba de implantación y la prueba de sensibilidad cutánea.

Antes de la colocación del implante las ratas fueron sometidas a un adormecimiento para evitar el sufrimiento del animal en el momento del proceso quirúrgico, colocándolas en una campana de vidrio especial en donde se impregnó una

gasa con cloroformo (grado ACS de Fermont), a continuación las ratas fueron colocadas en el interior de la campana por un momento muy breve.

Posteriormente las ratas fueron rasuradas de la parte dorsal con una rasuradora eléctrica para evitar irritación en la piel del animal.

Por último, los implantes fueron colocados con apoyo de una veterinaria patóloga, realizando incisiones de 1 cm de diámetro, implantando el material en el tejido subcutáneo y cerrando la incisión con hilo quirúrgico, se colocaron 3 variantes del material en la parte cervical, lumbar y sacra de la parte dorsal de la rata.

6.8. Prueba de sensibilización cutánea.

Para evaluar si los andamios PLLAHA y PLLAHAinj generan una respuesta inflamatoria ya sea con eritema, edema o pueda no generar respuesta alguna. Se llevó a cabo una implantación de los andamios PLLAHA y PLLAHAinj de forma intradérmica a 3 grupos experimentales de 4 ratas Wistar (300-350 gr), un grupo fue tratado con los materiales de PLLAHA y PLLAHAinj y un control positivo (gasa estéril) y un control negativo (solo el tejido sin implante) para crear una respuesta de hipersensibilidad de la piel. Después se colocaron intradérmicamente los andamios PLLAHA y PLLAHAinj y se observó la respuesta que se generó sobre los tejidos a los 5 días, 33 días y 99 días después de la exposición del material, estas observaciones podrán ser desde muy leves hasta muy severas con enrojecimiento intenso e inflamación. El grado de respuesta y el porcentaje de animales que muestren una reacción frente a los andamios PLLAHA y PLLAHAinj serán la base para estimar el grado de alergenicidad del material.

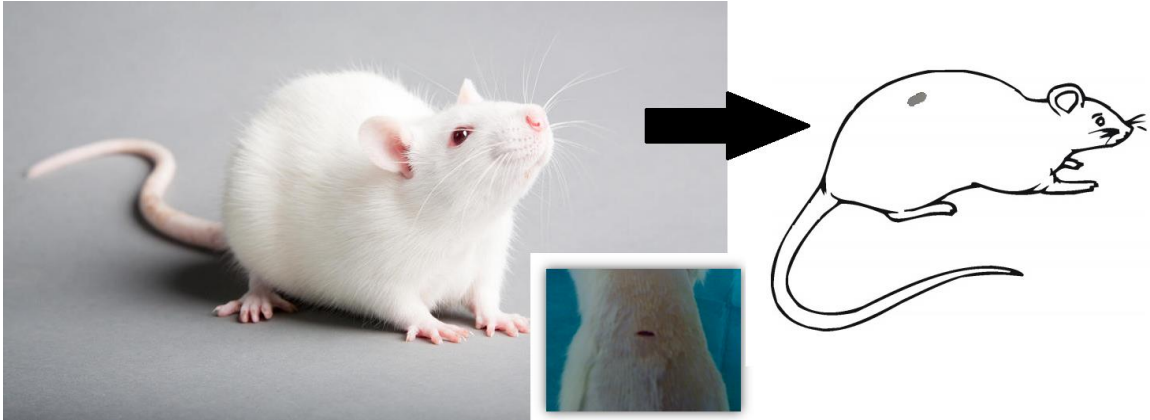


Figura 15. Prueba de irritación cutánea.

6.9. Prueba de Implantación.

Para evaluar los andamios de PLLAHA y PLLAHAinj que entrarán en contacto con tejidos subcutáneos o hueso, ya que determinan la alergenicidad, inflamación crónica o formación de tumores. Se usaron 8 ratas Wistar (200-300 gr) cada una conteniendo una variante del material, gasa estéril como control positivo y un control negativo (solo tejido). Se colocaron los implantes intramuscularmente. La prueba de implantación a corto plazo se realizó colocando los andamios de PLLAHA y PLLAHAinj directamente entre las fibras musculares de los animales. Se colocaron tanto las muestras como controles en zonas aparte y se dejaron durante 47 y 96 días (Figura 15), posteriormente la respuesta de los tejidos fue evaluada histológicamente.

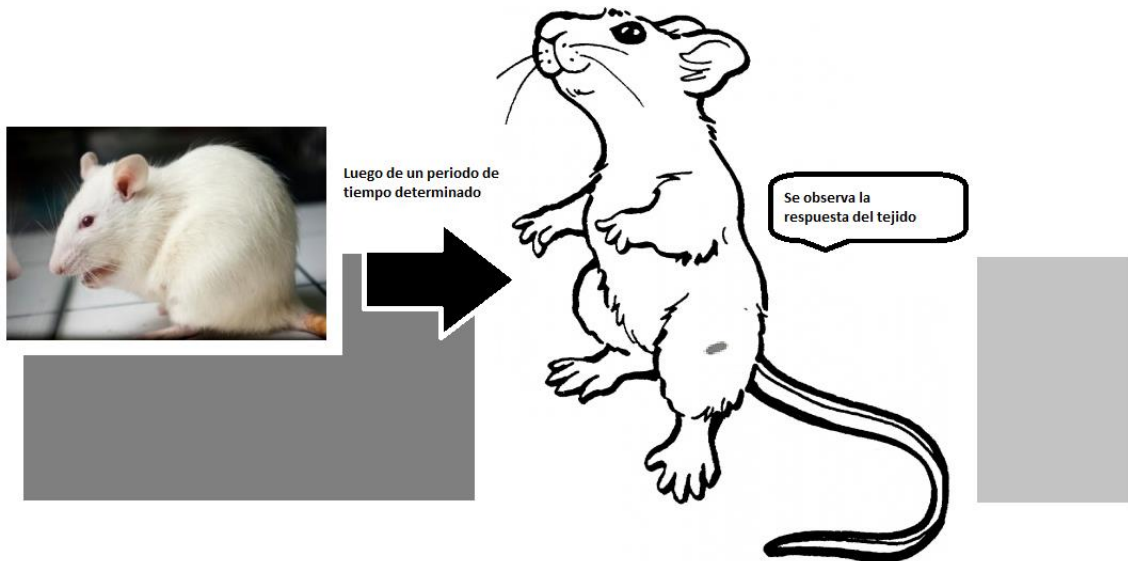


Figura 16. Prueba de implantación.

6.9.1. Estudio histopatológico

Las muestras de tejido fueron fijados en formol al 10 % durante 48 hrs., posteriormente se llevó a cabo una deshidratación manual, prosiguiendo con una inclusión en parafina, después se procedió a la realización de cortes de dos micras de espesor, se recurrió a la tinción con hematoxilina eosina y se tomaron 33 microfotografías en secuencia con el orden alfabético de las cápsulas, con microscopio Nikon Modelo Eclipse E 200, con oculares 10 x y cámara Sony modelo Cyber-shot de 10.1 megapíxeles.

6.9.2. Análisis estadístico

Se utilizó los hallazgos histopatológicos como variables para el tratamiento estadístico. Como medida de resumen para variables cuantitativas se determinaron medidas de tendencia central y dispersión (medias y desviaciones estándar). Para determinar diferencias significativas sobre los hallazgos histopatológicos se realizó

ANOVA de medidas repetidas, tomando un nivel de significancia de $p < 0.05$. La comparación de los componentes principales se realizó con ajuste de Bonferroni. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa SPSS 11.5 para Windows.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Descripción de las muestras

Las muestras son fibras de PLLA de alto peso molecular como raíz con hidroxiapatita injertada en diferentes concentraciones (PLLAHA), estas fibras fueron preparadas por la técnica de electrohilado (Figura 17) y colectadas en forma de una plantilla en donde las fibras se encuentran dispuestas al azar.

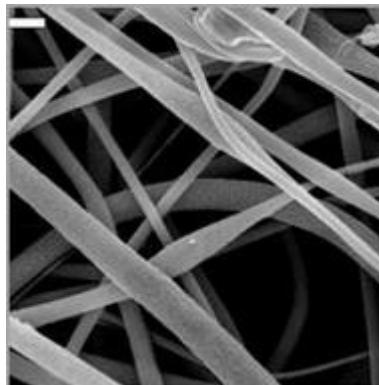


Figura 17. Fibras de poli (L-lactida) con hidroxiapatita injertada.

En total se tienen 8 variantes de los andamios como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Diferentes variaciones de material de andamios de PLLAHA

Clave de la Muestra	Descripción
PLLAHA4	Poli (L-lactida) con 4% hidroxiapatita pura
PLLAHA4inj	Poli (L-lactida) con 4% hidroxiapatita injertada
PLLAHA10	Poli (L-lactida) con 10% hidroxiapatita pura
PLLAHA10inj	Poli (L-lactida) con 10% hidroxiapatita injertada
PLLAHA20	Poli (L-lactida) con 20% hidroxiapatita pura
PLLAHA20inj	Poli (L-lactida) con 20% hidroxiapatita injertada
PLLAHA30	Poli (L-lactida) con 30% hidroxiapatita pura
PLLAHA30inj	Poli (L-lactida) con 30% hidroxiapatita injertada

7.1.1. Preparación de las muestras

Estas plantillas o andamios de PLLAHA fueron recortados en cuadros con puntas romas con 0.5 cm x 0.5 cm de diámetro, con tijeras de disección y fueron colocadas en

cajas petri estériles cubiertas con papel aluminio (el cual fue utilizado como material colector al momento de la síntesis de las fibras en el electrohilado). Los andamios fueron esterilizados colocándolos en una campana de seguridad biológica híbrida tipo II (marca Lumistell) expuestas con luz ultravioleta por 30 minutos por ambos lados (protocolo de esterilización tomado de la Dra. Lizeth Fuentes del Hospital GEA González, Distrito Federal, México), experimento en donde los materiales fueron expuestos con diferentes tiempos en presencia de luz ultravioleta y después fueron utilizados como sustrato para el cultivo de células eucariotas no diferenciadas.

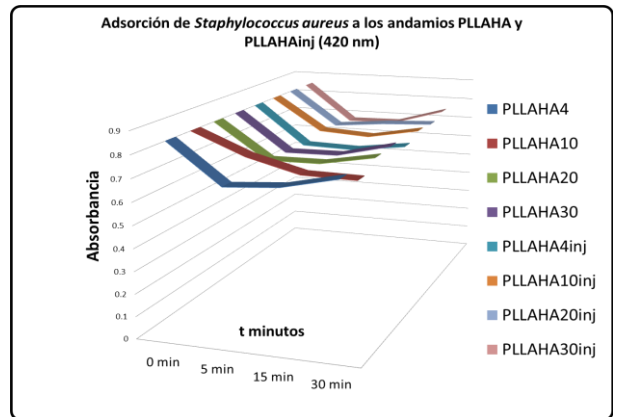
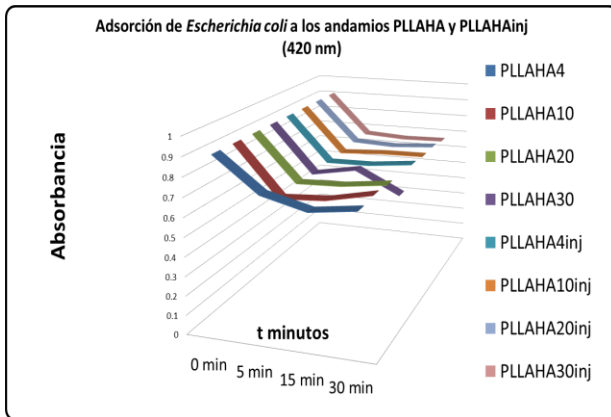
7.2. Ensayo de adhesión de células bacterianas

Con el propósito de evaluar si los andamios de PLLAHA y PLLAHAinj tienen una propiedad absorbente y/o adsorbente se realizó un ensayo en donde las diferentes variables de los materiales recortados se colocaron en viales estériles de 10 mL con fondo plano colocándolo como base del vial y se añadió una suspensión celular de *Escherichia coli* ATCC 25922 con una absorbancia de 0.905 y en otros viales una suspensión de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con una absorbancia de 0.853. Las suspensiones celulares bacterianas fueron cultivadas en presencia de los andamios por 5, 15 y 30 min a 37°C y se hicieron por triplicado. Se tomó la absorbancia inicial y la absorbancia final después de haber transcurridos los 3 diferentes tiempos, se extrajo las suspensiones celulares y se colocaron en celdas de espectrofotómetro UV/VIS, los valores de absorbancia se muestran en la Tabla 6. En la Tabla 6, se puede observar que a menor absorbancia obtenida en las lecturas mayor número de células fueron retenidas en el material, por lo que el material tiene más capacidad de absorción y retención

celular. La mayoría de los casos se observó una mayor retención celular a los 5 minutos de incubación de las suspensiones celulares tanto de *E. coli* como de *S. aureus*. Posteriormente, la retención fue disminuyendo por lo que la absorbancia aumentó ligeramente y a los 30 minutos en algunos materiales la absorbancia disminuyó y en otros aumentó, pero sin alcanzar la lectura inicial de ambas cepas.

Tabla 6. Ensayo de adhesión bacteriana (420 nm) n=3.

1.5 mL 420 nm	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
Muestra	t 5 min (Abs)	t 15 min (Abs)	t 30 min (Abs)	t 5 min (Abs)	t 15 min (Abs)	t 30 min (Abs)
Inicial	0.905	0.905	0.905	0.853	0.853	0.853
PLLAHA4	0.727	0.668	0.699	0.678	0.695	0.748
PLLAHA10	0.643	0.658	0.708	0.757	0.696	0.691
PLLAHA20	0.659	0.667	0.696	0.694	0.696	0.739
PLLAHA30	0.650	0.693	0.576	0.684	0.687	0.744
PLLAHA4inj	0.658	0.661	0.686	0.674	0.667	0.698
PLLAHA10inj	0.659	0.673	0.676	0.702	0.687	0.731
PLLAHA20inj	0.673	0.662	0.679	0.689	0.711	0.723
PLLAHA30inj	0.672	0.658	0.663	0.675	0.679	0.749



7.3. Ensayo de difusión en disco de los andamios PLLAHA y PLLAHAinj en biopelículas bacterianas

El método de antibiograma basado en difusión en este caso se utilizó para evaluar si la presencia de los andamios de PLLAHA provocan una inhibición en el

crecimiento bacteriano sobre medio sólido, se utilizaron las bacterias patógenas Gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 y las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para realizar este ensayo se recortó el material de manera circular con un radio de 0.5 cm creando discos PLLAHA. Los discos PLLAHA se colocaron sobre la superficie del agar nutritivo (como medio de cultivo) previamente inoculado homogéneamente sobre toda la superficie del medio con las bacterias patógenas antes mencionadas. Para la inoculación las bacterias se cultivaron en caldo nutritivo hasta alcanzar una absorbancia de 1.916 para el caso de *Escherichia coli* y una absorbancia de 1.036 para el caso de *Staphylococcus aureus*. Una vez llegada la concentración necesaria se tomaron 100 µL del inóculo y se distribuyeron homogéneamente sobre el medio de cultivo, a continuación se colocaron los discos PLLAHA y PLLAHAINj sobre la superficie del medio inoculado y se incubaron por 24 hrs a 37°C. Después de la incubación se buscó la presencia de halo de inhibición alrededor del material. Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado.

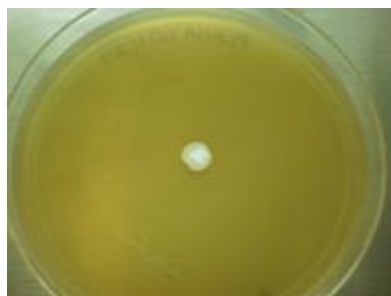


Figura 18. Ensayo de difusión en disco, los andamios PLLAHA y PLLAHAINj fueron evaluados con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Los estudios de difusión en placa usando las dos bacterias patógenas más comunes causantes de infecciones intrahospitalarias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus*

aureus mostraron que los andamios PLLAHA y PLLAHAINj son un excelente sustrato o un eficiente material que permite la adherencia celular ya sea bacteriana (como se demostró en este proyecto) o en células eucarióticas (Vera-Graziano, R. et al. 2012), estos resultados indican que todos los materiales no presentaron ninguna bioactividad que impidiera el crecimiento bacteriano sobre ella.

Hima-Bindu, T.V.L. et al 2010, también utilizaron el método de difusión para evaluar si existía actividad antimicrobiana de andamios de compositos (F6) de quitosano y gelatina utilizando bacterias Gram positivas y Gram negativas, estos investigadores al igual que en este proyecto incubaron las cepas bacterianas en cajas petri en presencia de los discos del material sobre el agar e incubaron por 24 horas a 37°C.

7.4. Ensayos de viabilidad celular: MTT e incorporación de rojo neutro.

Para ambos ensayos se cultivaron células de músculo de mioblasto de ratón C2C12 (ATCC® CRL-1772™) y células de Arteria Coronaria de Bovino (BCAEC), las cuales son células primarias, ambas líneas celulares fueron donadas por el Dr. Francisco Villarreal, investigador de la UCSD School of Medicine, San Diego, California, USA. Ambas células fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) con rojo fenol y 10 % de suero fetal bovino, en condiciones de esterilidad e incubadas a 37°C, con 5% CO₂. El medio de cultivo se cambió cada tercer día utilizando tripsina-EDTA, y fueron cultivadas hasta llegar al 100% de confluencia celular. En la Figura 19 se muestran las células a continuación.

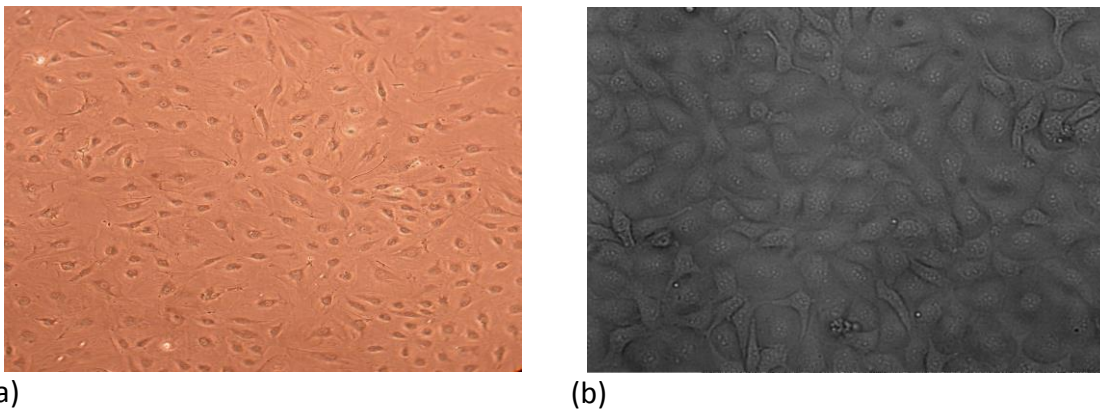


Figura 19. Líneas celulares utilizadas en los ensayos de viabilidad celular. (a) Células de músculo de mioblasto de ratón C2C12 en un 90% de confluencia tomada a 10X de aumento. (b) Células de Arteria Coronaria de Bovino (BCAEC) en un 100% de confluencia tomada a 20X de aumento.

Para ambos ensayos las dos líneas celulares se llevaron al 100% de confluencia en frascos T75 y se tripsinizaron para ser contados y ser llevados a un volumen final de 20 mL de medio DMEM con suero. Las células fueron contadas con la ayuda de un hematocitómetro (Cole-Parmer) obteniendo una concentración final de 20,000 células/mL para las células C2C12 y 23, 250 células/mL para las células BCAEC, estos resultados fueron obtenidos a través del cálculo de la siguiente fórmula:

$$\text{Conc.} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Número de células contadas}}{4 \text{ (cuadros)}} \times \text{Factor de dilución (4)}$$

En la Figura 20 se muestran los promedios de las absorbancias obtenidas por variante de material y la suspensión celular en cada una de las líneas celulares. Se puede apreciar que tanto en el ensayo MTT y el ensayo incorporación de rojo neutro, ninguna de las ocho variantes evaluadas provocan una disminución en la actividad celular de las células C2C12 ni las células BCAEC, comparadas con los controles negativos, los cuales representan el 100% de crecimiento celular. También se puede observar, que los

andamios promueven la proliferación celular al obtenerse absorbancias mayores a la del control, indicando una mayor presencia en la actividad mitocondrial y endocítica de las células. En tres de los cuatro ensayos realizados los andamios PLLAHA30 mostró ser capaz de aumentar la presencia celular en un 20% superior a la del control. Este tipo de resultados ya se han visto en experimentos realizados que evaluaron andamios electrohilados de PLGA, los cuales incrementaron el crecimiento celular en un 50% en comparación con otros andamios (Zamani, F. et al. 2013). Asimismo, el andamio PLLAHA4 aumentó en un 27% el crecimiento celular en células C2C12.

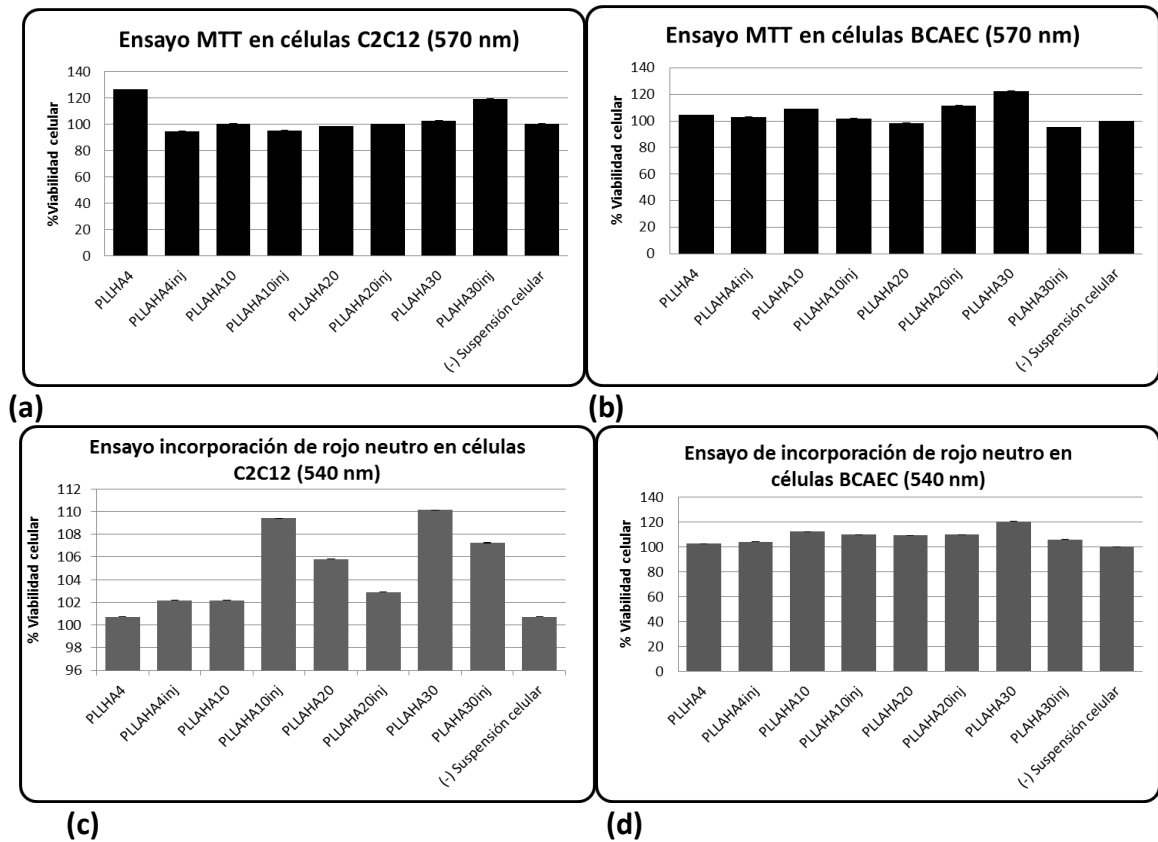


Figura 20. Resultados de la reducción de MTT a) células C2C12 y b) células BCAEC, e incorporación de rojo neutro, c) células C2C12, d) células BCAEC. Las barras representan la desviación estandar correspondiente (n= 3).

7.4.1. Análisis estadístico

El análisis de varianza ANOVA nos permite diferenciar entre las variantes del material, si existe una diferencia significativa entre la viabilidad celular afectada por los andamios. Para esto, tomamos el valor crítico para F, la cual indica la probabilidad de rechazar la hipótesis nula (todas los efectos en la viabilidad celular son iguales). Ya que, el nivel fijo de α es 0.05, encontramos que el valor crítico para F es mayor que 0.05 en los 4 ensayos de viabilidad celular (Tabla 7) entonces se puede afirmar que no se puede rechazar la igualdad de los efectos de los andamios en la viabilidad celular de ambas líneas celulares. Esto se traduce a que no existe una diferencia significativa entre el efecto causado por los materiales en la células expuestas.

Tabla 7. Análisis de varianza de un factor calculada a partir de los resultados de los ensayos de viabilidad celular.

Línea Celular	Ensayo	Valor crítico para F
C2C12	MTT	2.5
C2C12	Rojo Neutro	2.5
BCAEC	MTT	2.5
BCAEC	Rojo Neutro	2.5

7.5. Ensayos *in vivo*

7.5.1. Ensayo de sensibilización cutánea

Al haber transcurrido los primeros cinco días se procedió a extraer los materiales implantados y se obtuvieron los resultados siguientes:

7.5.1.1. Control Positivo

En la rata control, a la cual se le implantó la gasa estéril se observó a los cinco días crecimiento de hinchazón, no se visualizó enrojecimiento, pero si un comportamiento normal, sin embargo, la hinchazón tiene un tamaño de 1.3 cm de diámetro.

En pacientes humanos el hallazgo de un cuerpo extraño no es frecuente ya que es un acto iatrogénico (condición provocada por un médico de manera accidental). El término clásico *corpus alienum* deriva del latín, pero esta denominación es poco utilizada y su denominación es variada. En la búsqueda de evitar su mención directa se le conoce como oblitos, oblitomas, gazomas, compresomas, textilomas (Díaz- Plasencia, J., et al. 2001).

El 80 % de los *corpus alienum* corresponden a los denominados textilomas (gasa, compresa, campo quirúrgico). Del estudio fisiopatológico de los textilomas surge que las fibras de algodón provocan una reacción inflamatoria con exudación (extravasación de elementos causados por un trastorno en la microcirculación) en las primeras 24 horas. A partir del octavo día se forma un tejido de granulación que da paso a la organización de la fibrosis (formación o desarrollo en exceso de tejido conectivo fibroso en un tejido como consecuencia de un proceso reparativo o reactivo) a partir del décimo tercer día.

Las manifestaciones clínicas dependerán de la presencia o no de infección sobreagregada. Cuando el proceso es aséptico como el presente caso se produce la encapsulación o enquistamiento del cuerpo extraño por un tejido fibroso, o se incluye

en una visera maciza como por ejemplo el hígado (Figura 21) (Díaz- Plasencia, J., et al. 2001).

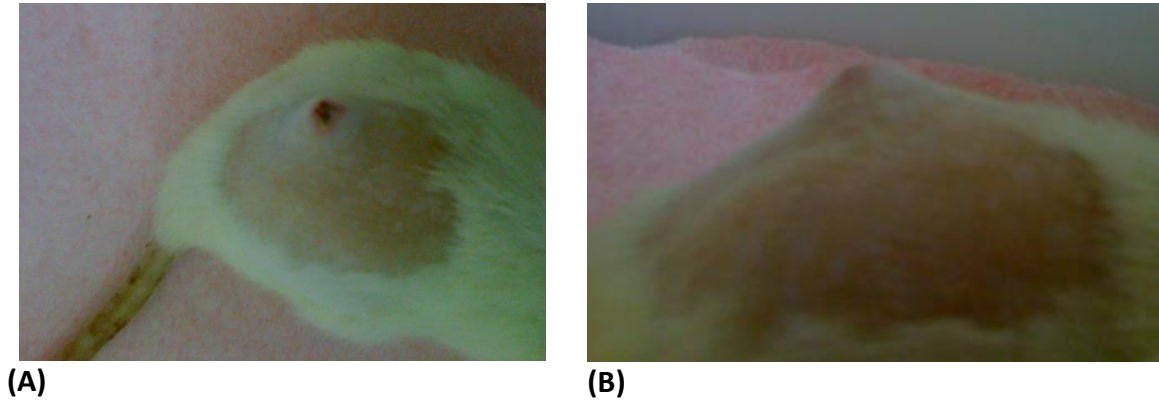
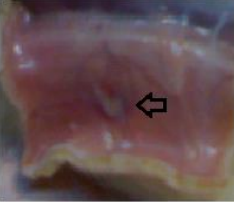
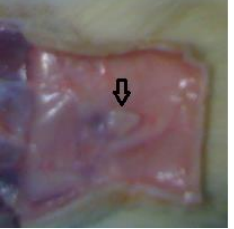
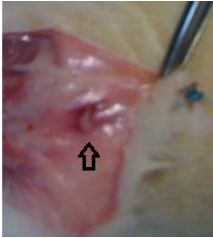


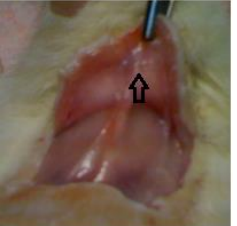
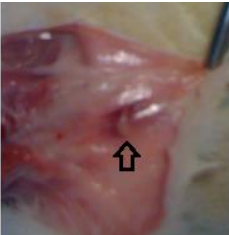
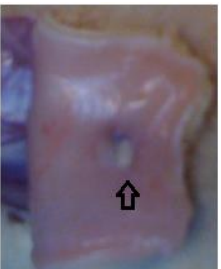
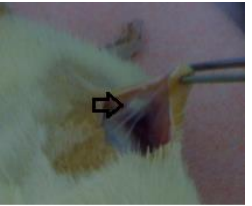


Figura 21. Toma de muestra de Tejido para el análisis histológico.

Para la toma de las muestras, se prepararon viales de 20 mL de vidrio y tapón de rosca, correctamente etiquetados con el nombre de las muestras y controles, se les colocó un volumen aproximadamente de 10 mL de solución de formaldehído amortiguado al 10%.

Tabla 8. Toma de muestra después de 5 días de haber sido implantados los materiales.

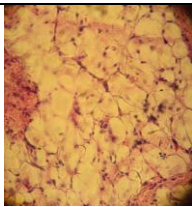
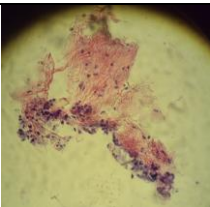
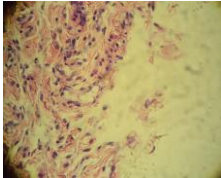
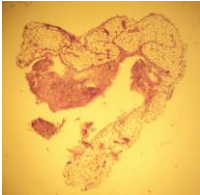
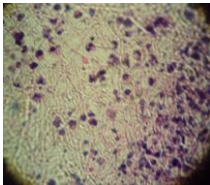
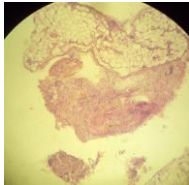
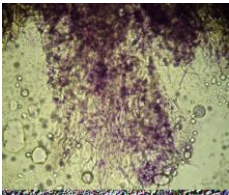
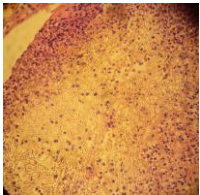

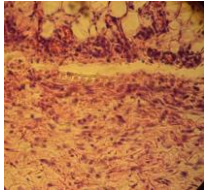
OBSERVACIONES	MUESTRA	OBSERVACIONES	MUESTRA
Se observó enrojecimiento leve alrededor del material, esta imagen insinúa una evidencia de irritación por parte del material.	PLLAHA4 	No se observó enrojecimiento en la zona subcutánea que rodea al material a los cinco días de haberse hecho el implante.	PLLAHA4inj 
Se observó enrojecimiento intenso alrededor del material, esta imagen insinúa una evidencia de irritación por parte del material.	PLLAHA10 	No se observó enrojecimiento en la zona subcutánea que rodea al material a los cinco días de haberse hecho el implante.	PLLAHA10inj 
No se observó enrojecimiento en la zona subcutánea que rodea al material a los cinco días de haberse hecho el implante.	PLLAHA20 	No se observó enrojecimiento en la zona subcutánea que rodea al material a los cinco días de haberse hecho el implante.	PLLAHA20inj 
Se observó enrojecimiento moderado alrededor del material, esto imagen insinúa una evidencia de irritación por parte del material.	PLLAHA30 	No se observó enrojecimiento en la zona subcutánea que rodea al material a los cinco días de haberse hecho el implante.	PLLAHA30inj 
La gasa estéril provocó una inflamación del tejido subcutáneo, un encapsulamiento del material por parte del organismo y un enrojecimiento alrededor del, por lo que evidentemente desencadenó una reacción adversa del organismo contra el cuerpo extraño.			Control (+) gasa estéril 

A pesar de que la mayoría de las observaciones macroscópicas del área alrededor de los implantes muestran una ligera reacción localizada, también se evidencia la ausencia de una reacción severa como en el caso de la gasa, que los andamios PLLAHA y PLLAHAINJ no indujeron una fibrosis, esto indica que el material aunque si es reconocido por el tejido circundante, éstos materiales no provocan un trastorno en la microcirculación por lo que no provoca ningún exudado, en consecuencia, la reacción del tejido hacia los materiales implantados es mínima.

Las muestras PLLAHA4, PLLAHA10 y PLLAHA30 mostraron enrojecimiento en el tejido adyacente al material, a esta ruborización en el tejido subcutáneo se le conoce como eritema, y es un proceso inflamatorio o inmunológico donde hay una alteración en la vascularización del tejido y hay acumulación de linfocitos, este proceso es causado por la presencia del material el cual provoca un estímulo, esto indica una reacción inflamatoria aguda presente. El resto de las muestras no se encontró eritema presente al momento de extraer las muestras. Posteriormente, al realizar los estudios histopatológicos, se encontró que los diez tejidos tienen reacción inflamatoria por cuerpos extraños (nanofibras y nanotubos de cristales).

Los frotis histológicos hacen constar que después de 5 días de haber implantado los materiales, éstos si son reconocidos por el sistema inmunológico, provocando reconocimiento de cuerpo extraño por las células nodulares o subdérmicas y macrófagos presentes en la subdermis, activando el proceso de señalización a través de citosinas, lo que provoca el reclutamiento o migración de células polimorfonucleares en todos los casos (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados del estudio histopatológico a los 5 días del implante. Impresión diagnóstica del médico patólogo el Dr. José Luis Pineda. A x 10= Aumento 10 veces.

Observaciones	Muestra	Observaciones	Muestra
Solo nanofibras y polimorfonucleares, no valorable el tejido. A x 100	 PLLAHA4nj	Tejido conectivo vascularizado con cristales en nanotubos. A x 40	 PLLAHA4inj
Solo cristales en nanotubos y polimorfonucleares, no valorable el tejido. A x 100	 PLLAHA10	Tejido adiposo y fibroconectivo con nanofibras. A x 40	 PLLAHA10inj
Tejido adiposo y muscular con nanofibras enredadas y polimorfonucleares. A x 400	 PLLAHA20	Tejido con necrosis, polimorfonucleares cristales en nanotubos. A x 40	 PLLAHA20inj
Cristales y polimorfonucleares. A x 100	 PLLAHA30	Tejido adiposo y conectivo con nanofibras enredadas y polimorfonucleares. A x 100	 PLLAHA30inj
Músculo estriado. A x 40	 CONTROL (-)	Tejido adiposo, músculo estriado y conectivo con linfocitos, células plasmáticas, nanofilamentos y células gigantes multinucleadas con cristales en su interior. A x 100	 CONTROL (+)

Para poder realizar un análisis estadístico es necesario convertir estas observaciones cualitativas en valores cuantitativos. Para esto, se han propuesto criterios para medir cuantitativamente la respuesta inflamatoria en el tejido, definiendo niveles

de respuesta inflamatoria del 1 al 4, se evalúa 1 cuando la respuesta inflamatoria está ausente, 2 cuando la respuesta es suave, esto implica presencia de macrófagos y células plasmáticas, 3 cuando la respuesta es moderada, en este nivel se pueden visualizar macrófagos, células plasmáticas, cápsulas de neutrófilos y linfocitos y por último, 4 cuando es severa y esta implica áreas de necrosis (Branislav, K. and Mirjana, V. 2009). Tomando como base este sistema de evaluación podemos decir, que la respuesta inmune inflamatoria provocada por los andamios de PLLAHA y PLLAHAinj después de cinco días de implantación va desde una respuesta suave a moderada.

Tabla 10. Resultados de la prueba de sensibilidad cutánea, muestras de tejido subcutáneo tomados después de 5, 33 y 99 días de la implantación. AR= Ausencia de Respuesta.

Muestras	Primera toma, 5 días	Segunda toma, 33 días	Tercera toma, 99 días
	Respuesta inmune	Respuesta inmune	Respuesta inmune
PLLAHA4	Células polimorfonucleares	Células gigantes	AR
PLLAHA4inj	AR	Células gigantes	Células gigantes
PLLAHA10	Linfocitos, células gigantes y células plasmáticas	Células gigantes	AR
PLLAHA10inj	Células polimorfonucleares	Células gigantes, cápsula de tejido fibroso	Células gigantes
PLLAHA20	Células polimorfonucleares	Células gigantes	Células gigantes
PLLAHA20inj	AR	Células gigantes	Células gigantes
PLLAHA30	Células polimorfonucleares	AR	Cápsula de tejido fibroso
PLLAHA30inj	Células polimorfonucleares	Células gigantes	Células gigantes, linfocitos
Control (+)	Necrosis, células polimorfonucleares, linfocitos	Necrosis, células polimorfonucleares, linfocitos	Necrosis, células polimorfonucleares, linfocitos
Control (-)	AR	AR	AR

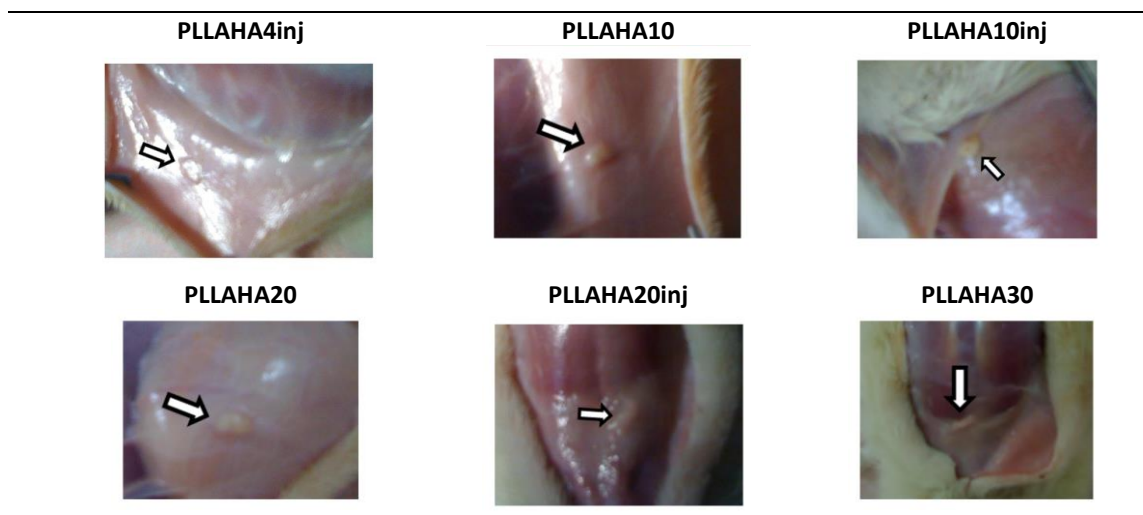
Los resultados de la Tabla 10 indican las observaciones obtenidas en la prueba de sensibilización cutánea en donde se implantaron los andamios en el dorso de las ratas Wistar y se dejaron 1 semana, un mes y tres meses, se tomaron las muestras, se tiñeron y se observaron al microscopio, entre los resultados obtenidos la mayoría de las

muestras provocan un reconocimiento del sistema inmunológico a los cinco días después de haber sido implantado los materiales, esta afirmación se debe a que se encontró presencia de células polimorfonucleares, linfocitos y células plasmáticas, células que se encuentran presentes en la inflamación y en la formación de una inflamación de tipo granulomatosa y no se encontró presencia de granuloma o encapsulamiento fibroso, sin embargo, como observación, en las muestras PLLAHA4inj y PLLAHA20inj no hubo evidencia de una respuesta tisular hacia los materiales. A los 33 días de haber sido implantado los materiales se puede encontrar en la mayoría de las muestras tejido adiposo y presencia de células gigantes a excepción de la muestra PLLAHA30, que no presentó evidencia de una respuesta tisular hacia el material, la presencia de células gigantes (macrófagos fusionados) sugieren la detección de cuerpo extraño y alta actividad fagocítica, indicando que los macrófagos están tratando de digerir el material; por otra parte, se encontró presencia de encapsulamiento fibroso en las muestras PLLAHA10inj a los 33 días de su implantación y PLLAHA30inj mostró ser encapsulado después de los 99 días. Por último, a los 99 días transcurridos, las células gigantes permanecieron presentes alrededor de los materiales a excepción PLLAHA4 y PLLAHA10, donde estas células ya no se encontraron presentes, se visualizó presencia de linfocitos en la muestra PLLAHA30inj y el control positivo mostró tejido necrótico a los 5, 33 y 99 días, demostrando que la gasa provoca una respuesta inmunológica persistente.

En la Tabla 11 se ven extracciones de los andamios a los 99 días de la implantación en el tejido subcutáneo, se puede apreciar que en todas hay un recubrimiento por tejido

adiposo y no provocan eritema o enrojecimiento en la parte adyacente al material, esto sugiere tolerancia por parte del cuerpo hacia el material, manteniéndolos aislados del tejido adyacente.

Tabla 11. Extracciones de los andamios PLLAHA y PLLAHAINJ a los 99 días de la implantación en el tejido subcutáneo.



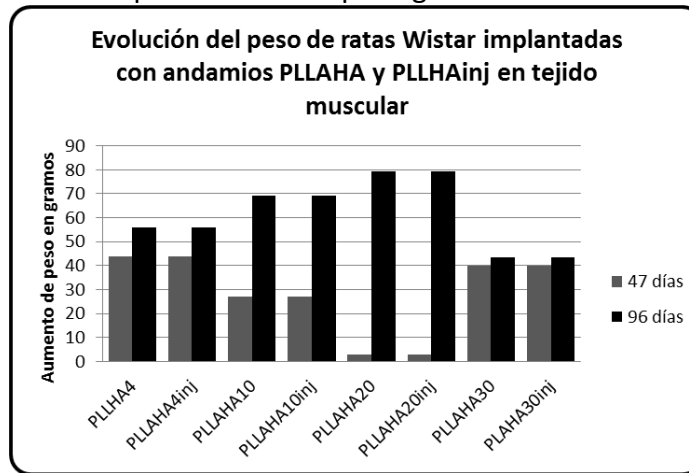
7.5.2. Prueba de implantación

Para este ensayo se utilizaron un total de 16 ratas Wistar, en donde se le implantó el andamio en la zona intramuscular de la pata derecha e izquierda del animal (*Biceps Femoris*), en la cual se trataron dos replicas por variante de material, los cuales se tomaron a dos tiempos, la primer toma de muestra se realizó después de un mes y la segunda toma de muestra después de 3 meses de la implantación.

Se registró el peso antes de la cirugía y después del sacrificio de los animales, para visualizar si se presentaba ganancia o disminución de peso y así correlacionarlo con alguna alteración metabólica en presencia del material, sin embargo, no se presenta ninguna variación valorable en la diferencia de pesos de los animales antes y después de la administración del implante, además se puede visualizar en la Tabla 12 como el peso

va en aumento de manera normal, solo se puede observar mas no inferir que la rata implantada con el material PLLAHA20 y PLLAHA20inj solo aumentó 2.8 gr de peso en 47 días.

Tabla 12. Aumento de peso de las ratas Wistar implantadas en gramos, después de transcurrir 47 y 96 días del procedimiento quirúrgico.



A continuación se muestran de manera resumida los resultados obtenidos de la prueba de implantación al pasar un mes y 3 meses de la intervención quirúrgica.

Tabla 13. Resultados de la prueba de implantación, muestras de tejido muscular tomados después de 47 y 96 días de la implantación. AR= Ausencia de Respuesta.

Muestras	Primera toma, 47 días	Segunda toma, 96 días
	Respuesta inmune	Respuesta inmune
PLLAHA4	Células gigantes, cápsula de tejido fibroso, necrosis	Linfocitos
PLLAHA4inj	Células gigantes, cápsula de tejido fibroso	Células gigantes, cápsula de tejido fibroso
PLLAHA10	Células gigantes, cápsula de tejido fibroso	Linfocitos
PLLAHA10inj	Células gigantes, cápsula de tejido fibroso	Linfocitos
PLLAHA20	Cápsula de tejido fibroso	Cápsula de tejido fibroso
PLLAHA20inj	AR	Células gigantes, cápsula de tejido fibroso
PLLAHA30	Células gigantes, cápsula de tejido fibroso	AR
PLLAHA30inj	AR	AR
Control (+)	Necrosis, células polimorfonucleares, linfocitos, granuloma	Necrosis, células polimorfonucleares, linfocitos, granuloma
Control (-)	AR	AR

Los resultados de la Tabla 13 Indican que después de 47 y 96 días después de haber sido implantado los andamios, el tejido muscular responde a la presencia de este cuerpo extraño, en todas las muestra se observa tejido muscular estriado, lo cual es una observación esperada ya que las muestras provienen de tejido muscular de la pierna de las ratas Wistar. El músculo estriado es un tipo de músculo que tiene como unidad fundamental el sarcómero (unidad anatómica y funcional del músculo), y que presenta, al verlo a través de un microscopio, estrías que están formadas por las que mantienen el mismo grosor en toda su extensión, y más largas que las del músculo liso. Estas fibras poseen la característica de contener abundantes filamentos y miofibrillas. El diámetro de las fibras musculares estriadas esqueléticas oscila entre 10 y 100 micrómetros. Estas fibras se originan en el embrión por la fusión de células alargadas denominadas mioblastos. En las fibras musculares esqueléticas, los numerosos núcleos se localizan en la periferia, cerca del sarcolema. Esta localización característica ayuda a diferenciar el músculo esquelético del músculo cardíaco debido a que ambos muestran estriaciones transversales pero en el músculo cardíaco el núcleo es central y único ya que las células tienen uno solo.

En los frotis histológicos, se encontró presencia de tejido adiposo en la muestra PLLAHA20 a los 47 días después de haber sido implantado el material y a los 96 días ya no se encontró, a lo contrario de las muestras PLLAHA4 y PLLAHA10 que presentaron presencia de tejido adiposo después de 96 días de la intervención quirúrgica y no a los 47 días. La presencia de tejido adiposo se encuentra relacionado a la misma respuesta del sistema inmune (aunque es importante destacar que los mecanismos que relacionan

al tejido adiposo de la respuesta inmune no se entienden por completo), ya que los adipocitos (células que conforman el tejido adiposo) sintetizan adipocinas, citosinas proinflamatorias y proteínas de señalización, de igual manera; los preadipocitos tienen la capacidad así como los macrófagos de fagocitar. Por último, algunas adipocinas, principalmente leptina, provenientes de los adipocitos maduros y activan células endoteliales y por ende la estimulación de la diapedesis de los monocitos y la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo blanco. Bajo estas condiciones, el incremento en la masa del tejido adiposo blanco y el subsecuente aumento de la expresión de las adipocinas inflamatorias y la disminución de adiponectina contribuyen al estado de inflamación crónica característico de la obesidad y el síndrome metabólico (Sánchez-Muñoz, et al. 2005). En un análisis realizado por Kaminski, E.J. et al 1977, estudios realizados con cortes histológicos de implantes definen que la presencia de tejido adiposo es un criterio adicional que puede ser considerado en términos de biocompatibilidad de un material implantado. Este estudio utilizó conejos albinos adultos que fueron expuestos a biomateriales implantados en el músculo sacro por periodos de 2, 6, 18 y 54 semanas. Se utilizaron 14 diferentes materiales implantados en el estudio. Los tejidos fueron examinados histológicamente buscando la apariencia de tejido graso adiposo en la membrana que rodea al implante: esta investigación demuestra, que los materiales no reactivos y biocompatibles presentaron un encapsulamiento por una membrana de tejido adiposo, mientras los materiales no compatibles no presentaron este fenómeno (Kaminski, E.J. et al 1977). Estos resultados indican que las muestras PLLAHA4, PLLAHA10 y PLLAHA20, presentaron presencia de

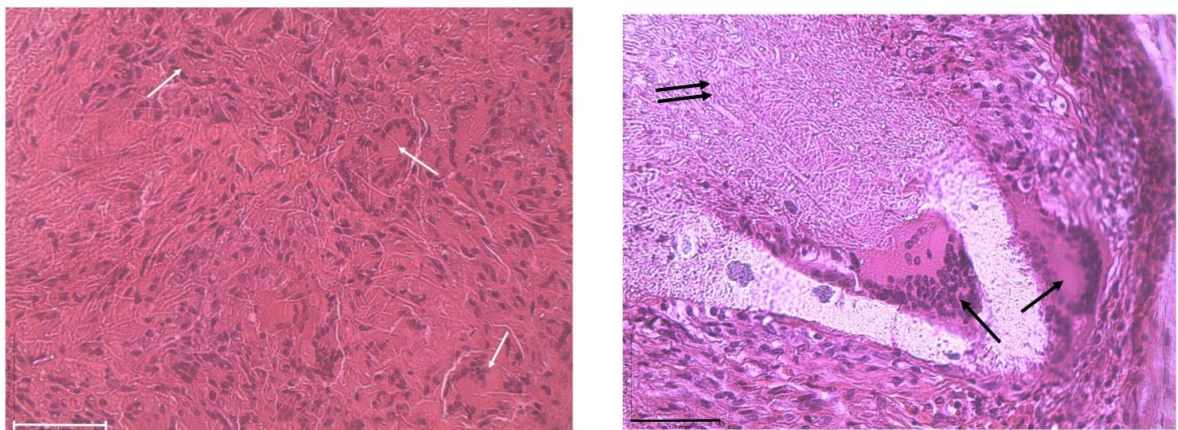
tejido adiposo en la observación microscópica y macroscópicamente en todas las muestras se observó un recubrimiento por una membrana de tejido graso, lo cual esto es un indicativo que los andamios de PLLAHA y PLLAHAinj mostraron características de materiales compatibles en tejido muscular (Figura 22), además en todas las extracciones de los materiales, no se encontró presencia de necrosis ni irritación en el tejido adyacente del material, este tejido se observó sano y normal.



Figura 22. Materiales implantados en el músculo de la pata de la rata (*Biceps Femoris*) después de 47 días de haber sido implantado el material. (a) PLLAHA10, (b) PLLAHA30, y (c) PLLAHA30inj. En (a), (b) y (c) pueden observarse material graso que recubre a los materiales.

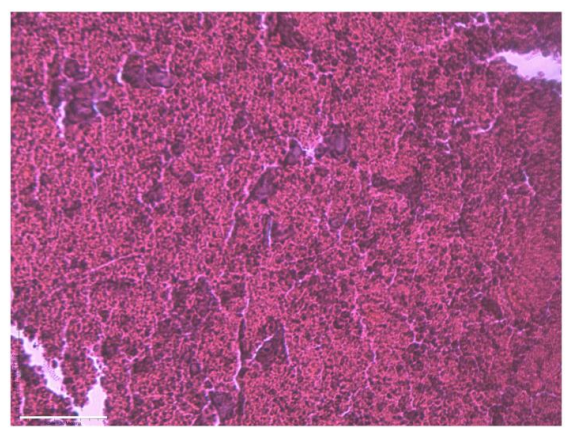
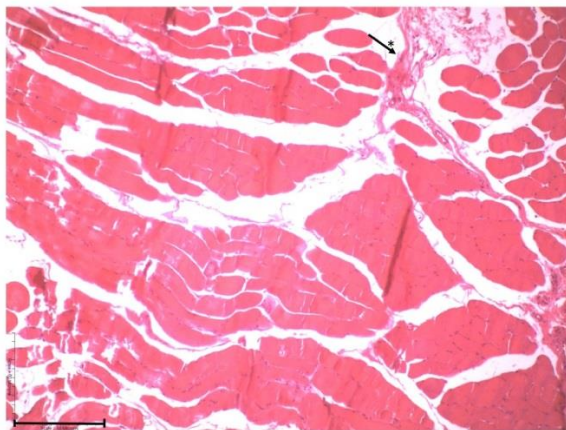
A pesar de estos hallazgos, a los 47 días hubo presencia de células gigantes y un encapsulamiento por tejido fibroso en la mayoría de las muestras a excepción de los andamios PLLAHA10inj y PLLAHA20inj. A los 96 días hubo presencia de linfocitos en las muestras PLLAHA4, PLLAHA10 y PLLAHA10inj, ausencia de respuesta en los andamios PLLAHA30 y PLLAHA20inj y encapsulamiento por tejido fibroso en las muestras PLLAHA4inj, PLLAHA20 y PLLAHA20inj (Figura 23). También, podemos notar que consecutivamente las tres muestras que presentaron presencia de tejido adiposo también presentaron encapsulamiento por tejido fibroso, por lo que se puede comprobar la relación estrecha entre el tejido adiposo al sintetizar adipocinas y el reclutamiento de los fibroblastos al sitio del implante para formar la cápsula. La única

muestra que presentó granuloma y necrosis fue la muestra PLLAHA4 en tejido muscular después de 96 días de haber sido implantado. La presencia del granuloma, linfocitos y células gigantes sugieren que el sistema inmunológico reconoció a los andamios PLLAHA y PLLAHAINj de igual manera, y provocó una respuesta de encapsulación del material para tratar de degradar y fagocitar al implante, sin embargo, la presencia del granuloma después de tres meses, indica la incapacidad de los macrófagos de digerirlos.



(a)

(b)



(c)

(d)

Figure 23. Andamios de PLLAHA y PLLAHAINj en tejido muscular. (a) PLLAHA10 a los 46 días después de la implantación (A x 400) (b) PLLAHA10inj a los 47 días después de la implantación (A x 400) (c) Tejido normal como control (A x 100). Escala de la barra = 50 micrones, flecha sencilla= células gigantes, flecha doble= andamios, flecha con *= tejido adiposo.

Hay estudios que afirman que la presencia de granuloma en materiales implantados no siempre es un efecto de cuidado y no implican una incompatibilidad de los materiales con el huésped (Pistóia, A.D. and Figueiredo M.A.Z. 2002). Tal es el caso de Branislav, K. and Mirjana, V. 2009, que investigaron la biocompatibilidad de diferentes materiales dentales para obturación dental del conducto radicular (raíz de los dientes) implantados en tejido muscular de rata, a través del análisis de diferentes niveles de inflamación del tejido muscular. En esta investigación se utilizaron 3 materiales diferentes para ser implantados en los *Biceps Femoris* de ratas Wistar, los materiales fueron Sealapex (Kerr, Romulus, USA), AH-26 (DE Trey, Zurich, Switzerland) y Spongio material de cemento basado en poli (metil metacrilato) (PMMA) (US patent 4296209) y como control se utilizó cera estéril. Las ratas fueron sacrificadas después de 30 y 60 días de la implantación y la respuesta inflamatoria fue evaluada con los métodos histológicos estándares utilizando hematoxilina y eosina como tinción diferencial. La implantación de Sealapex produjo una inflamación aguda fuerte, infiltración con presencia masiva de polimorfonucleares y células gigantes, así mismo, AH-26 produjo una reacción fuerte alrededor del cuerpo extraño con infiltración linfocítica primordialmente, los investigadores aseguran que la presencia de células gigantes y macrófagos demuestra evidencia de alta actividad fagocítica, de igual forma, el PMMA implantado provocó la formación de una cápsula fibrosa de tejido conectivo constituida por fibroblastos y fibrocitos alrededor del material, después se formó tejido granulomatoso. Esta reacción es muy similar a la reacción control del material inerte de

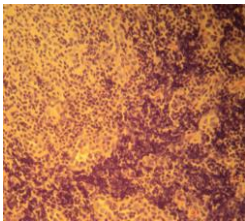
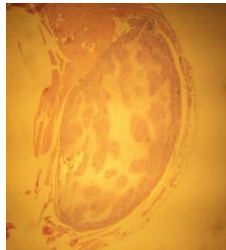
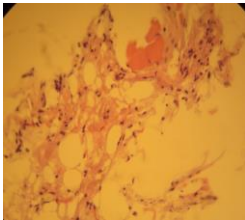
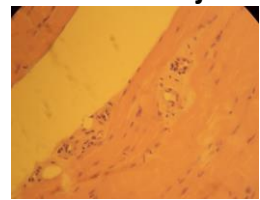
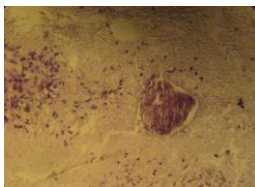

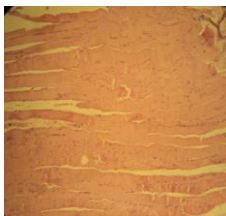

cera estéril. Con estos hallazgos, los investigadores sugieren biocompatibilidad del PMMA (Branislav, K. and Mirjana, V. 2009).

Los resultados anteriores sugieren, que la formación del granuloma de cuerpo extraño y el encapsulamiento de fibroblastos es una respuesta inmunológica normal de materiales implantados inertes, materiales que se consideran biocompatibles, materiales que no provocan necrosis tisular.

En otro estudio, realizado en la Universidad de São Paulo, Brasil, en donde se evaluó el efecto regenerativo de matrices orgánicas de hueso en formas micro y macrogranulares (Gen-Ox™, Baumer SA, Ministry of Health registration #103.455.00001) los cuales son biomateriales naturales obtenidos de hueso esponjoso bovino. Al implantar estos materiales, se observó presencia de infiltrados inflamatorios crónicos, con macrófagos y células gigantes multinucleadas (también observadas en el presente proyecto), los cuales caracterizan una reacción granulomatosa de cuerpo extraño, que evidentemente sugiere que las partículas implantadas presentan un carácter antigénico bajo en los conejos, como se ha observado en otros estudios (Carneiro, E. et al. 2005; Taga R, et al. 1997). Estos estudios, sugieren que la formación del granuloma de cuerpo extraño puede inhibir la formación de hueso, fenómeno que no fue observado en el estudio, considerando que la presencia de una reacción inflamatoria fue leve y no interfirió con el proceso de formación del hueso en los grupos de conejos implantados con matriz ósea micro y macrogranular. Esta afirmación está basada en el hecho de que algunas células gigantes multinucleadas se encuentran

íntimamente relacionadas a la superficie de las partículas, mostrando evidencia de una actividad de resorción (Carneiro, E. et al. 2005).

Tabla 14. Estudio histopatológico de los andamios PLLAHA y PLLAHAinj a los 47 días del implante. A x 10= Aumento 10 veces.

Observaciones	Muestra	Observaciones	Muestra
Adiposo con histiocitos y linfocitos, sin cuerpos extraños. A x 100.	PLLAHA4 	Se observa músculo estriado con formación de granuloma con histiocitos, células gigantes multinucleadas, cristales alargados y nanotúbulos. A x 40.	PLLAHA4inj 
Tejido adiposo con linfocitos, sin cuerpos extraños. A x 100.	PLLAHA10 	Músculo estriado con discreto infiltrado de linfocitos perivasculares, sin cuerpos extraños. A x 100.	PLLAHA10inj 
Músculo estriado con granulomas, histiocitos, nanotúbulos y cristales amorfos. A x 100.	PLLAHA20 	Músculo estriado con granuloma, histiocitos, células gigantes y nanotúbulos. A x 100.	PLLAHA20inj 
Músculo estriado sin alteraciones. A x 40.	PLLAHA30 	Músculo estriado sin alteraciones. A x 40.	PLLAHA30inj 

7.5.3. Análisis estadístico

Para la realización de los cálculos estadísticos, previamente se transformaron las observaciones de las respuestas tisulares del sistema inmunológico en la zona del implante, de un valor cualitativo (Nivel de respuesta: ausente, leve, moderado y agresivo) a valores cuantitativos (1, 2, 3 y 4), respectivamente (Tabla 15).

Tabla 15. Nomenclatura utilizada para clasificar los niveles de respuesta tisular observada en los tejidos adyacentes a los implantes.

Código de respuesta	Nivel de respuesta	Características de la respuesta
1	Ausente	Respuesta inflamatoria está ausente
2	Leve	Presencia de macrófagos y células plasmáticas
3	Moderado	Macrófagos, células plasmáticas, cápsulas de neutrófilos y linfocitos
4	Agresivo	Áreas de necrosis

En la Tabla 16 se puede apreciar todas las respuestas tisulares observadas en los diferentes días de toma de muestra, así como cálculos estadísticos básicos los cuales nos pueden sugerir el comportamiento individual y global de cada uno de las observaciones realizadas para cada material. Estos cálculos promueven la idea de que el andamio PLLAHA20 (con una media de 2.8 y una varianza de 0.2) provocó mayor respuesta del sistema inmunológico al haber presencia de células polimorfonucleares, neutrófilos, linfocitos y granuloma de cuerpo extraño. La muestra que provocó menor respuesta tisular fue la PLLAHA30inj (con una media de 1.2 y una varianza de 0.2) ya que solo presentó presencia de células del sistema inmunológico a después de 5 días de haber sido implantado en tejido subcutáneo y posteriormente ya no se presentó ninguna respuesta o respuesta demasiado leve

como para ser considerada. Las muestras PLLAHA4inj y PLLAHA10inj presentaron niveles de respuesta muy similares entre ellos. El control negativo solo fue la incisión del bisturí en el tejido, y el control positivo, una gasa estéril la cual provocó una respuesta muy agresiva y evidenciada en el tejido adyacente del material. Cabe destacar que en ninguno de los materiales se observaron células bacterianas o evidencias de infección. Por lo que puede asegurarse un adecuado manejo de las muestras estériles, así como el procedimiento aséptico utilizado para la realización de estos experimentos. Posteriormente, se realizó un análisis de varianzas para visualizar si existe una diferencia significativa entre las respuestas tisulares causadas por las ocho variantes de los andamios de PLLAHA y PLLAHAinj.

Tabla 16. Valores cuantitativos de los andamios PLLAHA y PLLAHAinj en los diferentes días de toma de muestra y cálculos estadísticos básicos del software Excel Microsoft®.

Muestras	5	33 días	47 días	96 días	99 días	Media	Desviación		%
	días						estándar	Varianza	
Respuesta inmune									
PLLAHA4	2	2	4	2	1	2.2	0.8	0.7	25.9
PLLAHA4inj	1	2	1	2	2	1.8	1.1	1.2	44.4
PLLAHA10	2	2	2	2	1	2.6	0.5	0.3	11.1
PLLAHA10inj	2	2	2	2	2	1.8	0.8	0.7	25.9
PLLAHA20	2	2	2	2	2	2.8	0.4	0.2	7.4
PLLAHA20inj	1	2	1	2	2	2.2	1.1	1.2	44.4
PLLAHA30	2	1	2	1	2	2.0	1.0	1	37.0
PLLAHA30inj	2	2	1	1	1	1.2	0.4	0.2	7.4
Control (+)	4	4	4	4	4	4	0	0	100.0
Control (-)	1	1	1	1	1	1.0	0.0	0	0.0

7.5.4. ANOVA (Análisis de Varianza)

El análisis de la varianza (ANOVA) es una potente herramienta estadística, de gran utilidad tanto en la industria, para el control de procesos, como en el laboratorio de análisis para el control de métodos analíticos. Los ejemplos de aplicación son múltiples, pudiéndose agrupar, según el objetivo que persiguen, en dos principalmente: la comparación de múltiples columnas de datos y la estimación de los componentes de variación de un proceso (Massart, D.L. et al. 1997).

En este caso el ANOVA nos permite diferenciar entre las variantes del material, si existe una diferencia significativa entre las respuestas tisulares que cada una provocó al entrar en contacto con el material. Para esto podemos tomar por ejemplo el valor de la probabilidad del valor F, la cual indica la probabilidad de rechazar la hipótesis nula (todas las respuestas tisulares son iguales). Ya que, el nivel fijo de α es 0.05, encontramos que el valor crítico para F es igual a 2.12402926 lo cual es mayor que 0.05 entonces se puede afirmar que no se puede rechazar la igualdad de las respuestas tisulares entre grupos. Esto se traduce que no existe una diferencia significativa entre las respuestas tisulares de los andamios (Tabla 17).

Tabla 17. Resultados del Análisis de Varianza

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	29.28	9	3.25333333	12.5128205	3.8175E-09	2.12402926
Dentro de los grupos	10.4	40	0.26			
Total	39.68	49				

De igual forma las muestras fueron comparadas a través de la gráfica cajas y bigotes calculada en el software Minitab®. En donde se puede apreciar que las muestras poseen diferencias entre sí en cuanto a la respuesta que causaron, sin embargo, no de manera importante como lo señala la prueba del ANOVA. Por otro lado, si se puede visualizar que comparando las muestras con el control negativo, la muestra que causó menor respuesta inmunológica es la PLLAHA30inj y la que causó una respuesta más evidente fue la PLLAHA20. Cabe destacar que ninguna de las variantes del material provocaron una necrosis evidente. Por lo que puede concluirse en todos los ensayos que todos los andamios son biocompatibles, no importando de manera significativa la proporción de hidroxapatita en los andamios (Figura 23).

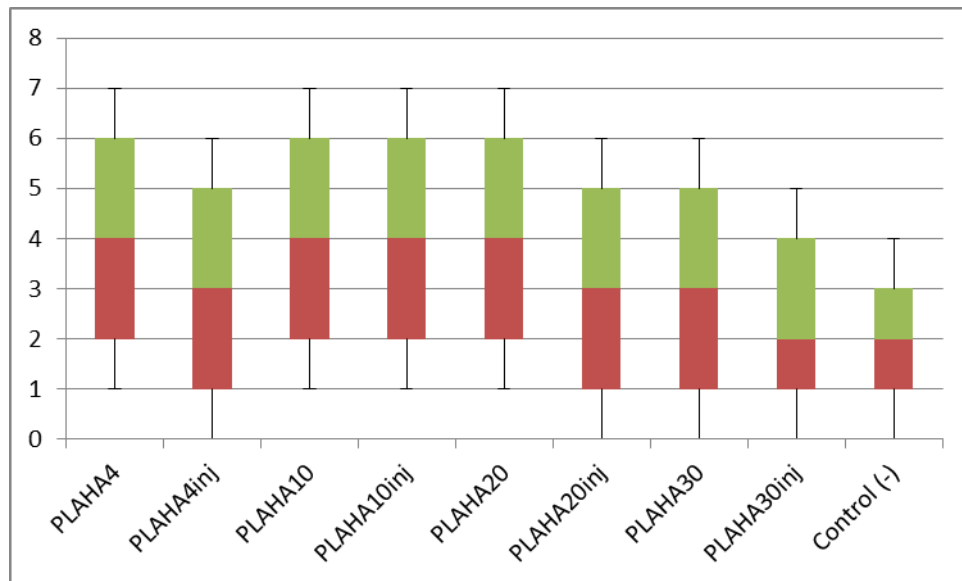


Figura 24. Comparación de los diferentes materiales a través de la gráfica de cajas y bigotes.

VIII. CONCLUSIONES

1. Tanto los andamios de PLLAHA como PLLAHAINJ en las diferentes variantes tienen buena absorción y retención celular bacteriana de las cepas *E. coli* y *S. aureus*.
2. Los andamios de PLLAHA y PLLAHAINJ son un excelente sustrato o un eficiente material que permite la adherencia celular ya sea bacteriana o en células eucarióticas, estos resultados indican que todos los materiales no presentaron ninguna bioactividad que impidiera el crecimiento bacteriano sobre ella.
3. En 3 de los 4 ensayos realizados los andamios PLLAHA30 mostró ser capaz de aumentar la presencia celular en un 20% superior a la del control.
4. El andamio PLLAHA4 aumentó en un 27% el crecimiento celular en células C2C12.
5. El andamio PLLAHA4INJ provoca formación del granuloma después de haber transcurrido un mes de la implantación tanto en el área subcutánea como en músculo.
6. La muestra PLLAHA30INJ aunque si provocó migración de células polimorfonucleares al área del implante no provocó reacción granulomatosa en tejido subcutáneo.
7. Los andamios PLLAHA y PLLAHAINJ, provocan de manera general, tanto en tejido subcutáneo como muscular, una respuesta inflamatoria suave a moderada,

esto implica la presencia de macrófagos, granulocitos y granulomas de cuerpo extraño, pero sin presentarse necrosis.

8. Estadísticamente, no existe diferencia significativa entre las respuestas tisulares provocadas por los PLLAHA y PLLAHAinj.
9. Todos los ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, demostraron que todas las variantes de los andamios PLLAHA y PLLAHAinj son biocompatibles.

IX. REFERENCIAS

1. Bergenholtz, G. Bacterial Leakage Around Dental Restorations-Impact on the Pulp. In: Anusavice, K.J. (ed). Quality Evaluation of Dental Restorations. Chicago: Quintessence Publishing. 1989; 243-252.
2. Bhat, S.V. Biomaterials. Narosa Publishing House. 2002; New Delhi.
3. Bolewska, J., Hansen H.J., Holmstrup, P., Pindborg, J.J., and Stangerup, M. Oral Mucosal Lesions Related to Silver Amalgam Restorations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1990; 70(1):55-58.
4. Bolewska, J., Holmstrup, P., Miller-madsen B., Kenrad, B., and Danscher, G. Amalgam Associated Mercury Accumulations in Normal Oral Mucosa, Oral Mucosal Lesions of Lichen Planus and Contact Lesions Associated with Amalgam. Journal Oral Pathology Medical. 1990; 10(1):39-42.
5. Branislav, K. and Mirjana, V. Biocompatibility of root canal obturation materials implanted in rat's muscular tissue. Acta veterinaria. 2009, 59(2-3): 267-276. doi:10.2298/AVB0903267K.
6. Brodin, P., Roed, A., Aars, H., Orstavik, D. Neurotoxic Effects of Root Filling Materials on Rat Phrenic Nerve In Vitro. Journal Dentistry Research. 1982; 61:1020-1023.
7. Carneiro, E., Garcia, R.B., Oliveira, R.C., Moraes, F.G., Menezes, R., Letra, A., Canova, G. Calichio, C., Tania, M., and Granjeiro, J.M. Microscopic and radiographic analysis of the effect of particle size of demineralized bovine

cancellous bone matrix on the repair of bone defects in femurs of rabbits.
Journal of Applied Oral Science. 2005, 13(2): 157-162.

8. Cell counting and dye exclusion viability assays using a hemacytometer. Tech Note. Nalge Nunc International Corp. Vol. 3 (25), 2000.
9. Delgado, R., Urbizo, J., Rodríguez, V., García, R., Cabaleiro, Z. and Iglesias, E. Evaluación anatomopatológica experimental de la implantación en hueso de la hidroxiapatita sintética (apafil-G). Revista habanera ciencia médica. 2006; 5(4).
10. Díaz, J., Martínez, C.E., Alfonso, A., Pardo, A.M., Esmérito, J., Salas, H., Puente, E. y Sedeño, N. Evaluación de la Toxicidad Aguda oral e Irritación sobre Mucosa Bucal de la Solución CM-95 Tratada Magnéticamente. Acta Toxicológica Argentina. 2008; 16 (2): 34-40.
11. Díaz-Plasencia, J., Tantalean Ramella, E., Balmaceda Fraselle, T. Cuerpo extraño en abdomen: a propósito de un caso. Revista gastroenterologa. 2001; 21 (3): 229-233. ISSN 1022-5129.
12. Duque, J.P. Biotecnología. Netbiblo. 2010; 3: 102. ISBN: 8497454855, 9788497454858.
13. Estrada, C., Paz, A.C. y López, L.E. Ingeniería de Tejido Óseo: Consideraciones Básicas. Revista Escuela de Ingeniería de Antioquia. 2006; 5: 93-100. ISSN 1794-1237.
14. Ferrer, Y. Hidroxiapatita como Sustituto de Tejido Óseo. Traumatología. 2008.

15. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The National Academies Press. 2011; 8. ISBN: 978-0-309-15400-0. www.national-academies.org.
16. Hauman, C.H.J. and Love, R.M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part1. Intracanal drugs and substances, International Endodony Journal. 2003; 36: 75-85.
17. Hench, L.L. and Jones, J.R. Biomaterials, Artificial organs and tissue engineering. CRC Press. 2005.
18. Hensten-Pettersen, A. and Jacobsen, N. Perceived Side Effects of Biomaterials in Prosthetic Dentistry. Journal Prosthetic Dentistry. 1991; 65: 138-144.
19. Hietanen, J., Pihlman, K., Forstrom, L., Linder, E., and Reunala, T. No Evidence of Hypersensitivity to Dental Restorative Metals in Oral Lichen Planus. ScandJ Dental Research. 1987; 95(4):320-327.
20. Hima-Bindu, T.V.L., Vidyavathi, M., Kavitha, K., Sastry, T.P. and Suresh-Kumar, R.V. Preparation and Evaluation of Chitosan-Gelatin Composite Films for Wound Healing Activity. Trends in Biomaterials and Artificial Organs. 2010; 24(3): 123-130.
21. Horst, M., Madduri, S., Gobet, R., Sulser, T., Hall, H. and Eberli, D. Scaffold Characteristics for Functional Hollow Organ Regeneration. Materials. 2010; 3: 241-263. ISSN 1996-1944.
22. Ikada, D.E. Challenges in tissue engineering. En Journal of The Royal Society Interface. 2006; 3(10): 589-601.

23. Jackson, L.R. and Fox, J.G. Institutional Policies and Guidelines on Adjuvants and Antibody Production. *ILAR Journal*. 1995; 37(3):141-150.
24. Kaaber, S. Allergy to Dental Materials with Special Reference to the Use of Amalgam and Polymethylmethacrylate. *International Dentistry Journal*. 1990; 40:359-365.
25. Ley General de Salud. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Secretaría General. Secretaría de Servicios Parlamentarios. Dirección General de Servicios de Documentación, Información y Análisis. Última Reforma DOF 09-04-2012.
26. Massart, D.L., Vandeginste, V.M.G., Buydens, L.M.C., de Jong, S., Lewi, P.J. and Smeyers-Verbeke, J. "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A", Elsevier. 1997. Amsterdam.
27. Mjör, I. A. Current Restorative Materials: Recent Developments and Future Needs. Prepared for Committee to Coordinate Environmental Health and Related Programs, PHS, DHHS. 1991.
28. Mjör, I.A. Biocompatibility of Non-Mercury Containing Restorative Materials. Prepared for Committee to Coordinate Environmental Health and Related Programs, PHS, DHHS. 1991.
29. Motskin, M., Müller, K.H., Genoud, C., Monteith, A.G. and Skepper, J.N. The sequestration of hydroxyapatite nanoparticles by human monocyte-macrophages in a compartment that allows free diffusion with the extracellular environment. *Biomaterials*. 2011; 32(35): 9470-82.

30. Muscular Dystrophy Association of the United States, 2004.
<http://www.mda.org>.
31. Nair, M.B., Varma, K., Kumary, T.V., Suresh Babu, S. and John, A. Cell Interaction Studies with Novel Bioglass Coated Hydroxyapatite Porous Blocks. Trends of Biomaterials for Artificial Organs. 2006; 19 (2): 108-114.
32. Norma española UNE-EN ISO 10993-5. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro.
33. Norma española UNE-EN ISO 10993-5. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro.
34. Norma ISO/DIS 10993-10. Biological Evaluation of Medical Devices part 10. Test for irritation and skin sensitization. 1992; 37-40.
35. North American Science Associates, Inc. 2008. Federal Drug Administration, FDA guidance, 1995.
36. Pistóia, A.D. and Figueiredo, M.A.Z. Submucous Implant of Abrasive Dental Materials in Rat Tongues: Clinical and Histological Evaluation. Brazilian Dental Journal. 2002; 13(2):103-108. ISSN 0103-6440.
37. Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. Biomaterials Science: An Introduction to Materials and Medicine. Elsevier Academic Press. 2004; 2: 13-735.
38. Rubin, E., Gorstein, F., Rubin, R., Schawarting, R. y Strayer, D. Patología estructural. Fundamentos clinicopatológicos en Medicina. Mc. Graw-Hill. 2006; 4 (1). Pág. 4-36. ISBN: 84-481-4562-3.

39. Sachlos, E. and Czernuszka, J.T. Making Tissue Engineering Scaffolds Work. Review on the Application of Solid Freeform Fabrication Technology to the Production of Tissue Engineering Scaffolds. *European Cells and Materials*. 2003; 5: 29-40. ISSN 1273-2262.
40. Sánchez, C. and Molina, M.J. *Plásticos Aplicados en Medicina*. Editorial UNED. 2011; 1: 1-364. ISBN13:9788436248371.
41. Sánchez-Muñoz, F., Garcia-Macedo, R., Alarcon-Aguilar, F. y Cruz, M. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gaceta Médica de México*. 2005; 141(6): 505-512. ISSN 0016-3813.
42. Shukor, Y., Baharom, N.A. and Rahman, F.A. Development of a heavy metals enzymatic-based assay using papain, *Analytica Chimica Acta*. 2006; 566: 283–289.
43. Stanley, H.R. Effects and Side Effects of Dental Restorative Materials—Dental Composites/Glass Ionomers. Local (Pulp and Soft Tissue) and Systemic Reactions. Prepared for Committee to Coordinate Environmental Health and Related Programs, PHS, DHHS. 1991.
44. Stanley, H.R. *Toxicity Testing of Dental Materials*. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL. 1985.
45. Stevens, M.M. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*. 2008; 11: 18-25.

46. Taga, R., Hassunuma, C.Y., Cestari, T.M. and Ferreira, P.M. Destino de membrana cortical ósea bovina colocada em posição subperióstica na calvária de cobaias. revista brasileira implantodontia. 1997, 3(6): 24-9.
47. Takamori, E.R., Figueira, E.A., Taga, R., Sogayar, M.C. and Granjeiro, J.M. Evaluation of the Cytocompatibility of Mixed Bovine Bone. Brazilian Dental Journal. 2007. 18 (3): 179- 184.
48. Taton, T.A. Nanotechnology: Boning up on biology. Nature. 2001; 412: 491-492. doi:10.1038/35087687.
49. Vallet-Regí, M. Biocerámicas: evolución y aplicaciones. Avances en Química. 2011, 107(1): 28–35.
50. Velasco-Peñal, M.A. y Garzón-Alvarado, D.A. Implantes Scaffolds para regeneración ósea. Materiales, técnicas y modelado mediante sistemas de reacción-difusión. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2009; 29(1).
51. Velazco, G. Ingeniería de Tejidos y andamios de Regeneración Celular. Acta Bioclinica. 2011; 1(1): 1-2.
52. Vera-Graziano, R., Maciel-Cerda, A., Moreno-Rondon, E.V., Ospina, A. and Gomez-Pachon, E.Y. Modified Polylactide Microfiber Scaffolds for Tissue Engineering. Material Research Society Symposium. 2012; 1376.
53. Zamani,F., Amani-Tehran, M., Latifi, M. and Shokrgozar, M.A. The influence of surface nanoroughness of electrospun PLGA nanofibrous scaffold on nerve

cell adhesion and proliferation. Journal of Material Sciences. Materials in
Medicine. 2013. PMID: 23494618.

54. Zar, J.H. Biostatistical analysis. 4ta Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ,
USA. 1999.

X. ANEXO I

DESCRIPCIÓN DEL MANEJO Y DISPOSICIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Toma y disposición de muestra biológica.

La toma de muestras biológicas fue bajo las medidas de seguridad estrictas y estuvo apegada a los lineamientos de las normas nacionales e internacionales vigentes que regulan estos procedimientos (descrito en la sección de toma y transporte de muestras). Las muestras fueron marcadas con el número clave de identificación de las ratas utilizadas en el proyecto. Dicho número estuvo relacionado con los datos documentados de los experimentos con el fin de resguardar la calidad del proyecto.

Análisis de los resultados del laboratorio.

El análisis de los datos y los procedimientos de laboratorio se realizaron en el Laboratorio 4 de histología. Los lineamientos están diseñados de acuerdo a normas vigentes que regulan este tipo de procedimientos.

Conclusiones y recomendaciones.

Las conclusiones del estudio se realizaron en base a los análisis de los grupos de animales de experimentación en los ensayos de sensibilidad cutánea e implantación.

Población objetivo.

Ratas Wistar utilizados para evaluar la biocompatibilidad de andamios de poli (L-lactida) con Hidroxiapatita pura e injertada.

Tamaño de la muestra.

Se utilizaron 24 ratas Wistar para evaluar la biocompatibilidad de andamios de poli (L-lactida) con hidroxiapatita pura e injertada.

Criterios de selección.

Aquellas ratas que se les administró, implantó o colocó algún andamio de poli (L-lactida) con hidroxiapatita pura e injertada.

Tipo de muestreo.

Aleatorio simple obedeciendo las variables propuestas en el proyecto.

Variables.

Andamios de poli (L-lactida) con diferentes proporciones de hidroxiapatita pura e injertada, la cual cambia las propiedades mecánicas de los materiales.

Diseño estadístico.

Se utilizó el peso corporal y los hallazgos histopatológicos como variables para el tratamiento estadístico. Como medida de resumen para variables cuantitativas se determinaron medidas de tendencia central y dispersión (medias y desviaciones

estándar). Para el análisis del peso corporal se verificó los supuestos de normalidad (pruebas de Kolmorov-Smirnov y Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene) en cada tiempo de evaluación. Para determinar diferencias significativas de peso corporal se realizó ANOVA de medidas repetidas, tomando un nivel de significancia de $p < 0.05$. La comparación de los componentes principales se realizará con ajuste de Bonferroni. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa SPSS 11.5 sobre Windows.

Toma de muestra.

La toma de muestra se realizó en la sala de manipulación animal en el zooterio, en un área perfectamente iluminada y cuidando el bienestar animal.

Preparación del lugar para la toma de muestra.

El lugar de la toma de muestra se mantuvo con una antisepsia completa a lo largo del muestreo, de forma que todo pelo, sea retirado. El método para eliminar el pelo dependerá de la localización del lugar del implante.

La toma de muestra sanguínea.

Las ratas fueron sujetadas por un manipulador experimentado. La vena se localizó claramente, en este caso será la vena lateral de la cola ya que es el sitio más común para esta toma, la punción se llevó a cabo cuidando en todo momento el bienestar animal. Si el animal muestra signos de incomodidad, fue tranquilizada y tratada con suavidad. Se tomó en cuenta algunas recomendaciones para mejorar la toma de muestras, colocando la cola de la rata en agua caliente o calentado a la rata en la jaula con una lámpara. Las venas se observan cuando la cola (rata) es levantada. La punta de la aguja puede verse como penetra en la vena. Esta es una técnica de fácil aplicación práctica pero el entrenamiento es fundamental.

Procesamiento de la muestra.

La sangre se mantuvo durante 2 horas a 37°C , posteriormente el plasma fue separado por centrifugación a 3000 rpm/15 minutos y congelado a -20°C .

Equipo para la toma de muestra.

Agujas de insulina
Jeringas de 1 ml de TB
Lámpara para calentamiento
Kit de disección estéril
Equipo de anestesia.

Transporte de muestras.

Los procedimientos de embalaje, transporte y disposición final de los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) se realizaron siguiendo las Normas Oficiales Mexicanas.

- 1.- Organización Mundial de la Salud. Guía para el transporte seguro de sustancias infecciosas y especímenes diagnósticos.
- 2.- Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCT2/1995, Especificaciones especiales y adicionales para los envases y embalajes de las sustancias peligrosas de la división 6.2 agentes infecciosos.
- 3.- Norma Oficial Mexicana NOM-003-SCT/2000, Características de las etiquetas de envases y embalajes destinadas al transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.
- 4.- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Sistema triple básico de embalaje.

1.- Recipiente primario.

El espécimen para diagnóstico (sangre o sus componentes) y debe depositarse en un recipiente hermético: tubo, frasco, u otros con tapa de rosca a prueba de filtraciones, que se colocarán en gradillas o con separadores que funcionarán como amortiguadores.

2.- Recipiente secundario.

Los recipientes primarios uno o varios se colocan en un segundo recipiente también hermético, a prueba de filtraciones, con objeto de proteger el (los) recipiente(s) primario(s). Si se colocan varios recipientes primarios se debe usar suficiente material amortiguador y absorbente para proteger a todos los recipientes primarios y evitar que choquen entre ellos.

3.- Paquete externo de envío.

El o los recipiente(s) secundario(s) se coloca(n) en un paquete externo de envío que protege su contenido de los elementos externos del ambiente, a fin de evitar posibles daños físicos y filtración de agua, mientras se encuentra en tránsito. Se deberán adherir a la parte interior del paquete externo que envió los documentos de copia de cuestionario y copia de historial clínico del paciente o así como copia de consentimiento de participación en el estudio, todos ellos dentro de un folder de papel y el de papel dentro de uno de plástico el cual estará debidamente adherido a la parte superior del paquete externo de envío.

Etiquetado.

1.- Recipiente primario.

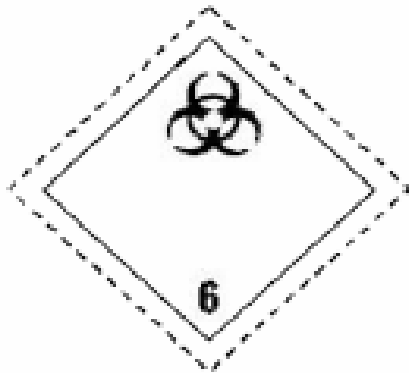
El recipiente primario debe estar debidamente etiquetado con el nombre y número de identificación del paciente, edad, fecha de toma de muestra (día/mes/año) y sexo.

2.- Etiquetado de recipiente secundario.

Los recipientes secundarios deben contener muestras para ser procesadas en un solo laboratorio. En estos casos deberán colocarse en la parte externa del recipiente secundario los siguientes tipos de etiquetas:

a. Etiqueta de Riesgo Biológico para Sustancias Infecciosas.

La Figura muestra las características de la etiqueta de Riesgo Biológico:



DIVISIÓN 6.2

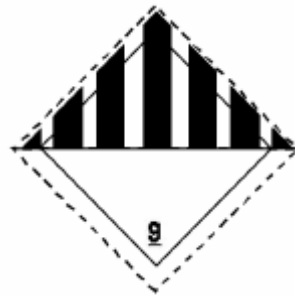
Sustancias infecciosas, la mitad inferior de la etiqueta podrá llevar las leyendas: "SUSTANCIA INFECCIOSA" y "EN CASO DE DAÑO, DERRAME O FUGA, AVÍSESE INMEDIATAMENTE A LAS AUTORIDADES SANITARIAS".

Símbolo: tres medias lunas sobre un círculo negro.

Fondo blanco, cifra "6" en el ángulo inferior.

b. Etiqueta de Riesgo Secundario.

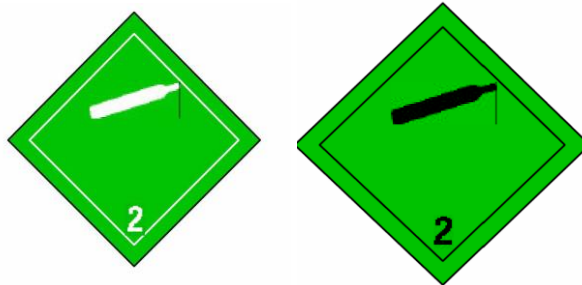
Si las muestras deben conservarse a baja temperatura con hielo seco (dióxido de carbono sólido), se debe incluir el siguiente tipo de etiqueta, que simboliza la existencia de riesgo secundario.



DIVISIÓN 9

Símbolo: 7 franjas negras verticales en la mitad superior. Fondo: blanco. Cifra "9" subrayada, en el ángulo inferior podrá llevar la leyenda "VARIOS".

En caso de utilizar nitrógeno líquido como refrigerante, se podrán utilizar cualquiera de los siguientes tipos de etiquetas:



DIVISIÓN 2.2

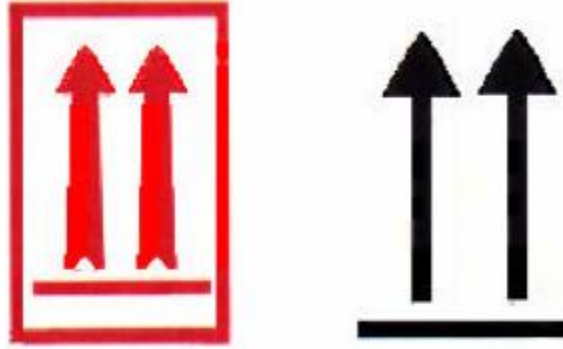
Símbolo negro o blanco. Fondo: verde. Cifra "2", en el ángulo inferior podrá llevar la leyenda "GAS NO INFLAMABLE".

Etiqueta con los datos del laboratorio de procedencia y destinatario

Remitente:
Destinatario:
Tipo(s) de Muestra(s):
Procedencia de la Muestra:
Microorganismo(s) por confirmar:

Etiqueta para orientación del embalaje o sobre-embalaje (la dirección de la flecha indica que lado va hacia arriba) cuando contengan sustancias peligrosas líquidas. Símbolo: dos flechas de color rojo sobre una línea horizontal en un recuadro del mismo color o dos flechas en color negro sobre una línea horizontal del mismo color sin recuadro. Fondo: contrastante, dimensiones mínimas: 74 mm X 105 mm.

Etiqueta para orientación del paquete.



3.- Etiquetado del paquete externo de envío.

El paquete externo contendrá el(los) paquete(s) secundario(s) para su envío a los laboratorios específicos. Sobre este y en una parte fácilmente observable deberán colocarse los siguientes tipos de etiquetas en la parte externa del paquete:

- a) Etiqueta de Riesgo Biológico para Sustancias Infecciosas. (ver etiquetado de recipientes secundarios)
- b) Etiqueta de Riesgo Secundario, en el caso de que las muestras sean conservadas a baja temperatura con hielo seco (dióxido de carbono sólido) o nitrógeno líquido. (ver etiquetado de recipientes secundarios)
- c) Etiqueta con los datos del laboratorio al que se dirigen las muestras y los datos del remitente.

Los datos deben de llenarse con letra legible para evitar confusiones.

Remitente: _____

Destinatario: _____

- d) Etiqueta para Orientación del Paquete. (ver etiquetado de recipientes secundarios)

Las etiquetas deberán considerar las dimensiones mínimas establecidas por la normatividad, como se muestra a continuación:



En el caso de que las dimensiones mínimas de la etiqueta sobrepasen el tamaño del paquete o recipiente, se podrán reducir sus dimensiones para que puedan colocarse correctamente.

Todas las etiquetas deberán colocarse en un lugar visible del paquete o recipiente, y de tal manera que se evite su desprendimiento. Asimismo, se deben colocar adecuadamente para evitar que se decoloren y rasguen.

XI. ANEXO II

OFICIO DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA FACULTAD DE PSICOLOGIA Y MEDICINA UABC PARA EL INICIO DEL PROYECTO

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

Tijuana, Baja California, 04 de junio de 2012
Oficio No. 874/2012-1

DR. RICARDO VERA GRAZIANO,
Presente.-

Por medio de este conducto, me permito informarle que se sometió a revisión a la Comisión de Bioética de esta Facultad, las modificaciones realizadas al estudio presentado por usted titulado "EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE ANDAMIOS DE POLI (LACTIDA) CON HIDROXIAPATITA PURA E INJERTADA PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDO DURO", el cual tuvo como resultado un dictamen APROBATORIO (se anexa).

Sin más por el momento, me despido de usted enviándole un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"

DR. ALFREDO RENÁN GONZÁLEZ RAMÍREZ
DIRECTOR



C.e.p.- Dra. Adriana C. Vargas Oyeda.- Coord. Posgrado e Investigación FMF
C.e.p.- Dirección
se

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA
Comité de Bioética

Tijuana, Baja California a 22 de Mayo del 2012.

DR. ALFREDO RENÁN GONZÁLEZ RAMÍREZ
DIRECTOR FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA
PRESENTE.

Por medio del presente y aprovechando para extenderle un cordial saludo se le notifica que, después de revisar la solicitud de revisión del proyecto de investigación con título:

“Evaluación de la biocompatibilidad de andamios de poli(lactida) con hidroxiapatita pura e injertada para la regeneración de tejido duro”

I.P.: Dr. Ricardo Vera Graziano

en comisión específica integrada por el Dr. Miguel Angel Fraga V. y por el MAE José Lorenzo Alvarado González, el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y Psicología, ha decidido el siguiente dictamen:

APROBADO

Los fundamentos para dicha decisión se basan en que dicho proyecto en el cual se utilizarán ratas para su desarrollo, cumple con los requisitos señalados en la Ley General de Salud en Investigación para la Salud en su Título Séptimo de la Investigación que incluya a la utilización de animales de experimentación en su Capítulo Único, Artículos 122, 123, 124 y 126, así como con las NOM correspondientes (062, 051 y 033).

La presente aprobación es para su aplicación en un período no mayor a **DOS AÑOS** a partir de la fecha del dictamen.

Sin más por el momento, quedo de Usted como su S.S.

Atentamente
“Por la Realización Plena del Hombre”

Dr. Miguel Angel Fraga Vallejo
Comité de Bioética FMyP

C.c.p. Archivo Comité de Bioética / D55



XII. ANEXO III

OFICIO DE CUMPLIMIENTO DE RESULTADOS POR EL COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA FACULTAD DE PSICOLOGIA Y MEDICINA UABC

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

Tijuana, Baja California, 30 de noviembre de 2012
Oficio 1826/2012-2

DR. RICARDO VERA GRAZIANO

Presente.-

Por medio del presente y aprovechando para extenderle un cordial saludo y notificarle que, después de revisar los resultados del proyecto de investigación con título:

“Evaluación de la Biocompatibilidad de andamios de polilactida con Hidroxiapatita pura e injertada para la regeneración de tejido duro”

I. P.: Dr. Ricardo Vera Graziano

En comisión específica integrada por el Dr. Miguel Angel Fraga V. y por el MAE José Lorenzo Alvarado González, el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina y Psicología, ha verificado que los resultados del proyecto son de acuerdo a lo acordado a la solicitud aceptada el día 22 de Mayo del 2012, por dicho comité.

Los fundamentos para dicha decisión se basan en que los resultados de dicho proyecto en el cual se utilizaron ratas Wistar, cumplió con los requisitos señalados en la Ley General de Salud en Investigación para la Salud en su Título Séptima de la Investigación que incluya a la utilización de animales de experimentación en su capítulo único, Artículos 122, 123, 124 y 126, así como las NOM correspondientes (062, 051 y 033).

Sin otro particular por el momento, quedo a sus órdenes para cualquier aclaración o duda.

ATENTAMENTE
“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE”

DR. ALFREDO RENÁN GONZALEZ RAMÍREZ
DIRECTOR

C.c.p.- Dirección
ARGR/mca

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE MEDICINA
Y PSICOLOGIA
CAMPUS TIJUANA