



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

---

---

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE**  
**POSGRADO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN**

**TESIS**

*“Efecto de una membrana compuesta de hidroxiapatita con alcohol polivinílico y ácido poliláctico sobre la regeneración ósea en fracturas con pérdida de tejido en la rata (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar: estudio piloto”*

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN**

**Presenta**

Dianelly López Torres

**Directores**

D. C. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros

Dr. Marco Antonio Morales Sánchez

Puebla, Puebla, México

Diciembre 2022

## DIRECTORES DE TESIS



---

D.C. LUIS GUILLERMO VÁZQUEZ DE LARA CISNEROS



---

DR. MARCO ANTONIO MORALES SÁNCHEZ



MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

## REVISORES DE TESIS



---

D.C. MARIO GARCÍA CARRASCO



---

D.C. MAURA CÁRDENAS GARCÍA



---

D.C. BEATRIZ TLATELPA ROMERO



MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado para realizar la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación a través de la beca con número de registro 771529, a la Vicerrectoría de Estudios de Posgrado a través de la beca con número de servicio 2132. Así como a las instituciones que hicieron posible la elaboración del presente proyecto: Facultad de Medicina y al laboratorio de Medicina experimental de la BUAP.

A mi asesor de tesis, el Dr. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros por haberme dado la oportunidad de ser parte de su labor científico, al Dr. Marco Antonio Morales Sánchez y Dr. Raúl Ricaño Rueda por haberme guiado en cada paso de la realización de este proyecto y compartirme los conocimientos de su gran trayectoria y finalmente al departamento de Anatomía Patológica de esta Facultad de Medicina de la BUAP.

## DEDICATORIA

### ***A mis familiares***

Por haber sido participes en cada paso, motivación y apoyo en el periodo de esta etapa.

### ***A mi director de tesis***

Por el apoyo y consejos brindados en cada paso de este proyecto.

### ***A mis asesores y docentes***

Quienes realizan la constante dedicación por formar nuestro aprendizaje.

### ***A mis amigos***

Por el apoyo y motivación brindados.

## RESUMEN

**Introducción.** La ingeniería de tejido óseo ha marcado en los últimos años un crecimiento acompañado de arduas investigaciones; por lo tanto, todavía enfrenta muchos desafíos. Dentro de la ingeniería de tejido óseo, el desarrollo de materiales que faciliten la regeneración ósea es un área de gran futuro.

**Objetivo.** Determinar en un estudio piloto el efecto de una membrana compuesta de hidroxiapatita (HA) con alcohol polivinílico (PVA) y ácido poliláctico (PLA) sobre la regeneración ósea en una fractura con pérdida de tejido.

**Material y Métodos.** Para este estudio piloto se utilizaron 12 ratas de la cepa Wistar, las cuales se evaluaron en diferentes etapas. En la primera etapa se utilizaron 6 ratas con el objetivo de estandarizar la técnica de modelo de fractura de fémur izquierdo, para la siguiente etapa de cirugía se utilizó un grupo control de 3 ratas sin membrana con clavo Kirschner y un grupo experimental; de 3 ratas con membrana de HA, PVA y PLA. Para la evaluación radiográfica de la fractura de fémur izquierdo y su regeneración la realizó un radiólogo experto a los 6, 15 y 30 días. La eutanasia de las ratas fue con una sobredosis de pentobarbital (80-90 mg x kilo). El fémur izquierdo fue diseccionado y colocado en formol amortiguado al 10% para su inclusión en parafina y su tinción con Tricromica de Masson. La evaluación histológica se realizó por un patólogo experto y se tomaron microfotografías que se analizaron con un software de código abierto con inteligencia artificial (Orbit Image Analysis).

**Resultados.** Para evaluar la regeneración ósea, se obtuvieron radiografías anteroposteriores a los 6, 15 y 30 días de la zona del fémur. El análisis radiográfico del grupo experimental mostró mayor regeneración perióstica a comparación del grupo control. En cuanto al análisis histológico es evidente que el depósito de hueso trabecular maduro es más abundante en el grupo de ratas que presentan la membrana.

**Conclusiones.** En este estudio observamos una mayor osificación en el grupo experimental que en el grupo control.

**Palabras clave.** Regeneración ósea, membrana de HA, PVA y PLA.

# CONTENIDO

LISTA DE CUADROS .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE TABLAS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
CAPITULO 1 .....	1
ANTECEDENTES GENERALES.....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
TEJIDO ÓSEO.....	1
MATRIZ ÓSEA.....	2
REGENERACIÓN ÓSEA.....	2
BIOLOGÍA DE LA CURACIÓN ÓSEA.....	3
FRACTURA ÓSEA .....	4
FRACTURA DEL HUESO LARGO .....	4
EXPERIMENTACIÓN ANIMAL .....	4
PRODUCCIÓN DE FRACTURAS .....	5
INJERTOS ÓSEOS.....	5
LA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO.....	6
ELECTROHILADO .....	7
BIOMATERIALES.....	8
ANDAMIOS.....	9
ALCOHOL POLIVINÍLICO .....	10
ÁCIDO POLILÁCTICO .....	10
HIDROXIAPATITA .....	11
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS DE ANDAMIOS APLICADOS PARA REGENERACIÓN ÓSEA ..	12
CAPITULO 2 .....	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
HIPÓTESIS.....	18
JUSTIFICACIÓN.....	18
OBJETIVOS.....	19

OBJETIVO GENERAL .....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
METODOLOGÍA .....	20
DISEÑO DEL ESTUDIO .....	20
REGISTRO DE PROTOCOLO .....	20
UBICACIÓN ESPACIO-TIEMPO .....	20
MARCO MUESTRAL.....	20
DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN.....	20
CRITERIOS DE SELECCIÓN .....	20
DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES Y ESCALA DE MEDICIÓN .....	21
TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	21
METODOLOGÍA PARA CADA OBJETIVO ESPECÍFICO.....	25
RESULTADOS .....	30
CREACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE FRACTURA ESTANDARIZADO CON PÉRDIDA DE TEJIDO EN FÉMUR DE RATA .....	30
ADAPTACIÓN DE UNA MEMBRANA COMPUESTA DE HIDROXIAPATITA, ALCOHOL POLIVINÍLICO Y ÁCIDO POLILÁCTICO EN EL DEFECTO ÓSEO DE FRACTURA GENERADO. .....	35
EVALUACIÓN RADIOLÓGICA.....	37
COMPARACIÓN EN CORTES HISTOLÓGICOS CAMBIOS RELACIONADOS CON EL PROCESO DE REGENERACIÓN ENTRE EL GRUPO CONTROL Y EL GRUPO EXPERIMENTAL. ....	39
DETERMINACIÓN DE OSIFICACIÓN.....	41
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES .....	45
CAPITULO III .....	46
SESGOS Y LIMITACIONES .....	46
FORTALEZAS .....	46
PERSPECTIVAS .....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS.....	54
1. REGISTRO DE PROTOCOLO.....	54
2. REGISTRO DE PROTOCOLO VIEP.....	55
3. BIOÉTICA.....	56
4. LOGÍSTICA.....	57

5.	VARIABLES DE MEDICIÓN.....	58
6.	CONSTANCIA CURSO DE MANEJO DE ANIMALES .....	59
7.	INFORMACIÓN DE BIOMODELOS.....	60
8.	IMÁGENES DE NECROPSIA EN RATA WISTAR .....	62

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de los grupos: control /membrana compuesta de hidroxiapatita con polivinil alcohol y ácido poliláctico

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Vista esquemática del proceso de electrohilado.	8
Figura 2. Etapas del proceso de producción de membrana compuesta.	23
Figura 3. Visualización de membrana de HA, PVA y PLA por microscopía óptica y SEM.	24
Figura 4. Proceso de cuantificación de condrocitos en el Software Orbit Image Analysis.	29
Figura 5. Cirugía en modelo post mortem de rata Wistar para exposición de fémur.	30
Figura 6. Cirugía de modelo de fractura con pérdida de tejido en hueso fémur.	32
Figura 7. Imágenes de necropsia en rata Wistar.	62
Imagen 8. Imagen representativa del procedimiento quirúrgico de modelo de fractura con pérdida de tejido en disección de hueso fémur de rata Wistar.	35
Figura 9. Radiografía de modelo de fractura con pérdida de tejido en fémur de rata Wistar.	35
Figura 10. Adaptación de membrana compuesta de HA, PVA y PLA sobre modelo de fractura estandarizado.	36
Figura 11. Evaluación radiográfica del grupo control a los 6, 15 y 30 días.	37
Figura 12. Evaluación radiológica del grupo membrana a los 6, 15 y 30 días.	38
Figura 13. Microfotografías de cortes histológicos.	40
Figura 14. Vista esquemática de la invasión celular y comportamiento durante el desarrollo de la osificación endocondral.	43
Figura 15. Esquema propuesto del posible mecanismo de la actividad celular en la membrana compuesta de HA, PVA y PLA.	45

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Material y métodos empleados en la elaboración de membrana compuesta (PVA, PLA e HA).	22
Tabla 2. Material y equipo en práctica para estandarización de fractura en fémur de rata (cepa wistar).	31
Tabla 3. Datos del procedimiento quirúrgico de estandarización de fractura I.	60
Tabla 4. Datos del procedimiento quirúrgico de estandarización de fractura II.	60
Tabla 5. Datos del procedimiento quirúrgico del grupo control.	61
Tabla 6. Datos del procedimiento quirúrgico del grupo experimental.	61
Tabla 7. Medición de longitud de callo óseo	39
Tabla 8. Análisis descriptivo de las laminillas analizadas con el software Orbit Image Analysis	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

Runx2	Factor de transcripción 2 relacionado con Runt
m-csf	Factor estimulante de colonia de macrófagos
RANKL	Activador del receptor de ligando NF- kB
PVA	Alcohol polivinílico
PLA	Ácido poliláctico
FDA	Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos
HA	Hidroxiapatita
BHA	Hidroxiapatita bovina
Gen	Gentamicina
Gel	Gelatina
PGA	Ácido poliglicólico
PLGA	Ácido Poli láctico- co- glicólico
PCL	Policaprolactona
CS	Quitosano
Sa-B	Ácido salvianólico
TC	Tomografía computarizada
nHA	Nanohidroxiapatita
MEC	Matriz Extracelular

---

## CAPITULO 1

### ANTECEDENTES GENERALES

#### INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejido óseo basada en andamios, se describe como una alternativa a las estrategias actuales de reparación de fracturas, la cual ha marcado en los últimos años un crecimiento acompañado de arduas investigaciones; sin embargo, todavía enfrenta muchos desafíos en los que es importante el análisis de las técnicas y limitaciones que se relacionen con un andamio (1).

En este trabajo, se estudia el papel de una membrana a base de hidroxiapatita (HA), alcohol polivinílico (PVA) y ácido poliláctico (PLA) como andamio para la consolidación ósea en un modelo murino de fractura ósea; la membrana en este trabajo ha sido desarrollada por investigadores de la Benemérita Universidad Autónoma mediante una técnica de electrohilado (2) .

#### TEJIDO ÓSEO

El hueso tiene la característica de ser un tejido conectivo mineralizado, es un órgano dinámico por reflejar continua absorción por los osteoclastos y neoformación por parte de los osteoblastos , realiza funciones importantes en el cuerpo humano como protección de los tejidos blandos, alojamiento de la médula ósea, almacenamiento de calcio, por mencionar algunos; en cuanto a sus células, el tejido óseo expone cuatro tipos: osteoblastos, las células del revestimiento óseo, osteocitos y osteoclastos (3).

*Células del Revestimiento óseo:* las funciones de este tipo de células aún no se comprenden del todo; pero son un componente principal de la *unidad multicelular básica* la cual es una estructura presente en la remodelación ósea, en cuanto a su actividad secretora estas células dependen del estado fisiológico del hueso y en cuanto a la interacción con otras células, evitan la intervención entre osteoclastos y matriz ósea cuando no se busca el proceso de resorción además de participar en la diferenciación de los osteoclastos (3).

*Osteoblastos:* Los osteoblastos tienen su origen de células madre mesenquimales y su diferenciación es llevada a cabo por RUNX2 (factor de transcripción 2

relacionado con Runt) el cual es un factor de transcripción maestro (4). Estas células forman parte de las llamadas “unidades de remodelado” que posterior a la fase de resorción cumplen la función de sintetizar nueva matriz ósea que posteriormente se mineralizará y formará hueso nuevo (5).

*Osteoclastos:* Son células de reabsorción ósea multinucleadas con morfología inusual, presentan una membrana que comprende dominios complejos con características que permiten la unión firme y dinámica de los osteoclastos a la matriz ósea; además de la resorción ósea, ahora se conoce que los osteoclastos tienen un papel en la homeostasis del organismo, en la regulación de la hematopoyesis, en la regulación de la formación ósea, así como en la regulación de la angiogénesis (6).

La regulación de funciones y formación de los osteoclastos tiene lugar por parte del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés) y el activador del receptor del ligando NF-kB (RANKL) (7).

*Osteocitos:* Estas células, derivan del linaje de las células madre mesenquimales, son consideradas las más predominantes en el tejido óseo, conforman de un 90 a 95 % del total de las células óseas y tienen la característica de estar rodeadas de matriz ósea mineralizada (3).

## **MATRIZ ÓSEA**

Dentro de los elementos de la matriz ósea se encuentra principalmente el colágeno (siendo el tipo 1 el principal componente) así como proteínas de tipo no colágenas como las glucoproteínas multiadhesivas (8) :

*Glucoproteínas multiadhesivas:* Este tipo de proteínas tiene la función de actuar en la adhesión de las células óseas y fibras colágenas a la sustancia fundamental mineralizada, las proteínas más importantes que pertenecen a este grupo son la **osteonectina** y la **osteopontina**, la primera con la función de medir adhesión entre el colágenos y los cristales de hidroxapatita y la segunda con función de medir la adhesión de las células a la matriz ósea.

## **REGENERACIÓN ÓSEA**

La regeneración ósea se define como aquel proceso fisiológico que es complejo y bien definido de formación ósea, este proceso forma parte de la constante

remodelación ósea en la vida adulta además de observarse durante la curación de una fractura; en este tema, cuando se presentan condiciones clínicas complejas se requiere regeneración ósea en gran cantidad, y para esto, en la actualidad existen estrategias para aumentar un proceso de regeneración ósea insuficiente que van desde el injerto autólogo al empleo de andamios osteoconductores (9).

En el ciclo de la remodelación ósea la resorción ósea es llevada por los osteoclastos y es seguida de la formación de hueso osteoblástico, donde los osteoblastos van a llenar las lagunas que anteriormente fueron reabsorbidas hasta el nivel inicial; De manera más específica este proceso consta de fases como la activación, reabsorción, reversión y formación, no obstante descripciones enfocadas a la comunicación osteoclasto-osteoblasto, mencionan solo tres fases: inicio, transición y terminación de la remodelación (10).

### **BIOLOGÍA DE LA CURACIÓN ÓSEA**

La curación biológica de las fracturas es un proceso complejo que necesita seguir patrones regenerativos específicos, posterior al trauma el hueso puede presentar dos tipos de curación: la directa e indirecta; la curación directa se caracteriza por requerir una reducción anatómica de los extremos de la fractura, no existe formación de espacios y necesita una fijación estable, en cambio la curación indirecta es la forma más común de curación de una fractura y consiste en no requerir reducción ni condiciones rígidamente estables (11).

El proceso de curación ósea incluye una serie de componentes celulares que son indispensables para la progresión de la curación, así las células inflamatorias son el componente inicial seguidas de células progenitoras mesenquimales, células endoteliales, los condrocitos, los osteoblastos y los osteoclastos; es decir que estos componentes celulares siguen una secuencia que inicia con la fase inflamatoria, fase fibrovascular, y concluye con la remodelación del callo óseo (12).

*EVALUACIÓN DE LA FRACTURA ÓSEA:* La evaluación de la curación de las fracturas sigue siendo un desafío para los profesionales, la tomografía computarizada y las radiografías representan herramientas frecuentemente utilizadas, pero hasta el momento no se ha definido un estándar de oro; dentro de estas dos,

la tomografía computarizada se considera apta para evaluar propiedades macro y microestructurales (13).

El médico necesita de un análisis compuesto para saber el estado de consolidación ósea y para esto, la tomografía computarizada se considera como obligatoria para confirmar la consolidación ósea en la pseudoartrosis; la puntuación REBORNE es una puntuación de cicatrización para evaluar específicamente la consolidación de pseudoartrosis, tanto en radiografías como en tomografía computarizada (14).

## **FRACTURA ÓSEA**

Una fractura se define como la pérdida de continuidad del tejido óseo y puede ser de tipo parcial o total, una descripción más detallada es cuando el diagnóstico de la fractura involucra una serie de lesiones presentes en vasos sanguíneos, musculatura, tendones, ligamentos entre otros; en cuanto a su etiología existen dos grandes causas: determinantes y predisponentes; por otra parte la clasificación general de fracturas se divide: por su mecanismo de lesión, por su localización anatómica, por el número de fragmentos, por la morfología del trazo y según su desviación (15).

## **FRACTURA DEL HUESO LARGO**

Los huesos largos tienen el diseño que corresponden a funciones tales como, mover la mano hacia el espacio y la deambulación, a su vez, presentan patrones inherentes de carga los cuales están estrechamente relacionados con sus funciones individuales; en cuanto a la aplicación de fuerza, reciben cargas “puras” de cuatro formas: tensión, compresión, flexión y torsión (16).

## **EXPERIMENTACIÓN ANIMAL**

A lo largo del tiempo, los experimentos científicos con animales han contribuido un avance importante en el campo de la investigación, en el siglo V a.C., ya se mencionaban algunos informes con animales; sin embargo, no fue sino hasta el siglo XIX donde su uso ha sido más frecuente y que a la fecha permite describir varias razones para el uso de animales en estudios, desde investigar enfermedades

humanas, pruebas de toxicidad, así como enseñanza y reforzamiento de habilidades quirúrgicas (17).

Se entiende por modelo a la representación o descripción que refleja la función o estructura de un sistema u objeto, siendo así el modelo animal un organismo vivo donde se puede estudiar un fenómeno de interés; estos fenómenos a su vez, permiten estudiar enfermedades y sistemas biológicos de una manera que no es aplicable en humanos (18).

## **PRODUCCIÓN DE FRACTURAS**

En el contexto de aplicación de andamios en experimentación *in vivo* es importante establecer un adecuado modelo experimental de defecto óseo, con la finalidad de ser evaluado, viable y óptimo. Las propiedades antes mencionadas, permitirán un modelo que pueda contribuir a un estudio exitoso de andamio propuesto en estudios de ingeniería de tejido óseo.

El estudio de las fracturas óseas y diversos factores que las rodean como el proceso de curación se ha estudiado desde Galeno e Hipócrates, desde esa época existe una línea de investigación donde diferentes avances tecnológicos buscan soluciones para los problemas que afectan al hueso (19).

En los últimos años la investigación *in vivo* se ha enfocado en el estudio de problemas presentes en la consolidación ósea como la pseudoartrosis, los modelos de fractura generados en roedores son un claro ejemplo de diversos modelos animales que estudian la falta de unión; más allá de la producción de fractura, es importante estandarizar los procedimientos quirúrgicos y simular la condición clínica en humanos, con el objetivo de continuar líneas de investigación basadas en modelos anteriormente utilizados (20).

## **INJERTOS ÓSEOS**

Los injertos óseos se consideran el estándar para tratar fracturas esqueléticas, así como para el reemplazo y la regeneración del hueso; existen tres tipos principales de injertos óseos: autoinjertos, aloinjertos y sustitutos de injertos; sin embargo, los autoinjertos aunque son los más usados presentan limitaciones como morbilidad del sitio donante y los aloinjertos presentan limitaciones como el rechazo

inmunológico, por estas razones se conduce a la necesidad de búsqueda de sustitutos de injertos óseos (21).

*SUSTITUTOS DE INJERTOS ÓSEOS:* La evolución de sustitutos de injertos óseos da lugar a cambios en los requisitos y propiedades de los biomateriales utilizados, la evolución se puede medir definiendo tres generaciones: los sustitutos de injerto óseo de primera generación, los cuales requieren que el biomaterial coincida con las propiedades del tejido, los sustitutos de segunda generación que provocan osteoconducción y finalmente los de tercera generación, los cuales se basan en el concepto de ingeniería de tejido óseo; estos últimos se acercan a las características de los autoinjertos ya que muchos biomateriales son capaces de inducir respuestas celulares específicas (21).

Los sustitutos óseos además se han colocado en los últimos años como temas principales por su popularidad ya que ante los autoinjertos y aloinjertos ofrecen ventajas como evitar el riesgo de adquirir enfermedades infecciosas de donantes (22).

## **LA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO**

La ingeniería de tejido óseo nace como opción de estas limitaciones y con el objetivo de restaurar, mantener o mejorar la función de un tejido mediante sus elementos clave: matrices tridimensionales (andamios), células y factores de crecimiento y diferenciación (23).

Los andamios como componentes esenciales en la ingeniería de tejido óseo deben presentar en su desarrollo condiciones óptimas las cuales sean capaces de promover la diferenciación celular; dentro de las propiedades de gran importancia que se mencionan son la biocompatibilidad, el reclutamiento celular, la formación de red vascular, así como propiedades mecánicas que, en el tema de diferenciación celular representan un factor clave (24). El tema de una rápida vascularización en los andamios resulta una propiedad ideal la cual involucra regulación de células y moléculas de señalización lo que permitirá concluir en una regeneración ósea (25).

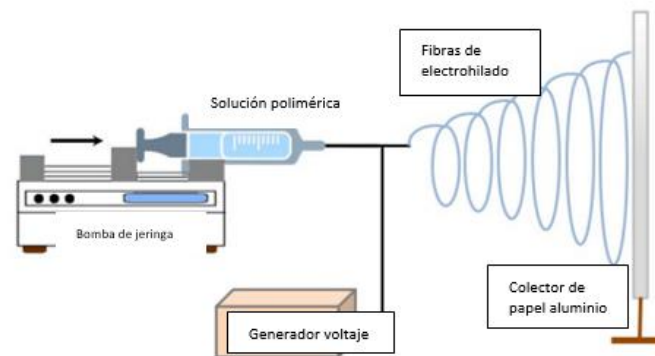
## **ELECTROHILADO**

La ingeniería de tejidos ha tenido importantes avances desde que se introdujo, su función se centra en mejorar o incluso restaurar la función de tejidos defectuosos mediante el uso de andamios, biofactores y células ósea (26). Existe una variedad de técnicas y estrategias en la literatura que apoyan a la ingeniería de tejido; sin embargo es el electrohilado que ha generado gran interés por fabricar estructuras con propiedades únicas (27).

El electrohilado es un proceso que fue diseñado para la industria textil, consiste en utilizar un campo eléctrico para controlar la deposición de fibras poliméricas sobre el sustrato objetivo, en la actualidad es altamente conocido por su capacidad para fabricar de manera económica fibras no tejidas en el campo de la ingeniería de tejidos actuando como andamios que puedan imitar la función y la forma natural de la matriz extracelular (28).

El electrohilado comúnmente utilizado es conocido como electrohilado en solución el cual ensambla fibras a partir de soluciones poliméricas en distintos disolventes, mientras que el llamado electrohilado de campo y por fusión mejoran la versatilidad del electrohilado; el electrohilado es un candidato prometedor para aplicaciones biomédicas debido a que las nanofibras electrohiladas ofrecen un número considerable de sitios de unión de agentes bioactivos (29).

En cuanto a las ventajas que ofrece esta técnica además de fabricar fibras poliméricas de manera económica, es ser considerada una técnica de proceso sencillo en producción, la cantidad de espacio requerida del equipo es reducido y genera fibras que van desde tamaños micrométricos a nanométricos además de proporcionar opción del diámetro de las fibras generadas (30). Actualmente además de mencionar el soporte que ofrece el electrohilado para la regeneración celular también se estudia la posibilidad de liberación controlada de medicamentos (31).



**Figura 1.** Vista esquemática del proceso de electrohilado. Tomado de Asmatulu (30).

## BIOMATERIALES

La decisión de elegir materiales degradables y no degradables debe ser un criterio tomado cuidadosamente. Los dispositivos biodegradables en tema de osteosíntesis han resultado exitosos, pero aún se recomienda continuar con el desarrollo y mejora de propiedades en conjunto. Una de las propiedades importantes es el rendimiento de degradación, el cual propone una clasificación de dos grupos: materiales biodegradables y materiales bioinertes; los materiales biodegradables están clasificados en 3 grupos principales: los polímeros (monómeros repetidos), cerámicas y metales (32).

**Polímeros:** Los polímeros biodegradables a su vez se dividen en dos grupos principales: Los polímeros naturales y los polímeros sintéticos (33). Dentro de los polímeros biodegradables naturales, podemos mencionar: El colágeno y el quitosano. Asimismo, los polímeros sintéticos incluyen: El Poli (ácido glicólico) (PGA), el poli (ácido láctico) (PLA), el ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) así como la policaprolactona (PCL) (32).

**Cerámicas:** La biocerámica se considera un elemento diseñado especialmente para temas de reparación y regeneración en zonas del cuerpo con lesión, existen diferentes formas para su aplicación en el uso clínico, como piezas sólidas, polvos, gránulos así como recubrimiento en prótesis articulares; en cuanto a la

función de su respuesta celular existe una clasificación que conforman tres familias principales: casi inertes, bioactivas y cerámicas reabsorbibles (34).

**Metales:** El magnesio así como el zinc son considerados como metales de elección en el campo de la ingeniería de tejido óseo, la aleación de estos dos elementos ha generado un gran interés debido a que ambos mejoran la resistencia a la corrosión además de no demostrar citotoxicidad para las células (32).

**Materiales mixtos:** Combinación de al menos dos tipos diferentes de los mencionados anteriormente.

## **ANDAMIOS**

**DEFINICIÓN:** Andamios o también conocidos como matrices de soporte, son materiales de uso biomédico combinados con factores de crecimiento y que tienen la finalidad de desarrollar sustitutos biológicos que puedan mejorar la función de órganos que han sido dañados así como mejorar la función de tejidos, de manera que los polímeros biodegradables son ideales para obtener estos andamios temporales que al mismo tiempo, pueden ser naturales o sintéticos y muestran un resultado prometedor dentro del contexto de la regeneración ósea (35).

**PROPIEDADES:** Al utilizar andamios, se debe considerar un diseño correcto con propiedades que puedan adaptarse con los diferentes tipos de defectos óseos de ahí que se busca que los materiales sean biocompatibles, no muestren efectos adversos por parte del huésped, además de servir como un material temporal que en un futuro pueda sufrir degradación junto con la formación de tejido nuevo; dentro de los criterios principales para un diseño apropiado de andamio se mencionan: el tipo de material, la arquitectura, la resistencia mecánica la osteoinductividad, así como su porosidad (1).

A su vez, el uso de andamios sintéticos electrohilados y degradables están diseñados para inducir regeneración endógena del tejido reemplazado por lo que una de las claves del éxito es el control de la respuesta inmune por parte del andamio y el potencial de regeneración que muestre el huésped; después del proceso de regeneración, se espera la degradación del andamio para evitar inflamación crónica, aunque este mecanismo no es muy claro, se sabe que existe

una relación de esta fase con células inmunes como los neutrófilos y macrófagos (36).

### **ALCOHOL POLIVINÍLICO**

El alcohol polivinílico (PVA), que se fabrica esencialmente a partir de acetato de polivinilo mediante hidrólisis, es fácilmente degradable por los organismos biológicos y en agua es un polímero de estructura cristalina solubilizado, además, es un polímero termoplástico ampliamente utilizado que es benigno para los tejidos vivos, inofensivo y no tóxico; el PVA es un polímero biodegradable y su degradabilidad se mejora mediante hidrólisis debido a la presencia de grupos hidroxilo en los átomos de carbono, es soluble en agua y tiene una naturaleza hidrófila (37).

Los hidrogeles de PVA han sido previamente utilizados para varias aplicaciones biológicas, debido a sus ventajas biológicas tales como: características no tóxicas, no cancerígenas, biodegradables y bioadhesivas con la facilidad de procesamiento, como resultado de estas últimas características, el PVA puede simular tejidos naturales y ser aceptado fácilmente en la implantación corporal, por estas razones, los geles de PVA se han aplicado en diferentes sitios de aplicación biomédica, como lentes de contacto, revestimiento para corazones artificiales, apósitos para heridas y administración de fármacos (38).

Las nanofibras poliméricas se han empleado como materiales en el campo de la regeneración de tejidos y la cicatrización de heridas, específicamente se ha observado que las nanofibras de alcohol polivinílico se desintegran en un entorno acuoso, por lo que en un estudio de Pelipenko y cols., se evalúan tres métodos de estabilización diferentes (39).

### **ÁCIDO POLILÁCTICO**

El ácido poliláctico (PLA) es un poliéster termoplástico que forma parte de los  $\alpha$ -hidroxi-ácidos, su materia prima sintética es el ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanoico) el cual es un ácido orgánico de origen natural y es el hidroxil ácido más sencillo que existe, además es una molécula quiral con isómeros tipo D y tipo L, a diferencia del isómero D, el isómero L es metabolizado por el organismo humano (40).

El ácido poliláctico ha sido aceptado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) como material biomédico, presenta buena biocompatibilidad y biodegradabilidad, además de que su modificación puede optimizar sus propiedades (41).

### **HIDROXIAPATITA**

La hidroxiapatita (HA) es considerada un biomaterial que sin duda se ha utilizado en campos como la odontología y la ortopedia, su excelencia la caracteriza para ser utilizada en todo tipo de restauraciones (42).

La hidroxiapatita sintética tiene una alta demanda por presentar una excelente biocompatibilidad y osteoinductividad, se presenta en diversas formas como recubrimientos, gránulos o cementos; Sin embargo, presenta algunas desventajas en cuanto a propiedades mecánicas (34).

## **ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

### **MATERIALES Y MÉTODOS DE ANDAMIOS APLICADOS PARA REGENERACIÓN ÓSEA**

Son diversos los estudios que proponen una combinación de materiales y técnicas basadas en la ingeniería de tejido óseo, las que a su vez han mostrado resultados con diferentes propiedades como biodegradabilidad, biocompatibilidad, osteoconductividad, entre otros; a continuación se mencionan estudios recientes basados en ingeniería y tecnología que proponen componentes capaces de inducir regeneración ósea:

Los andamios se describen como estructuras de soporte utilizadas que son utilizados por la ingeniería de tejidos, incluyen dentro de sus propiedades estructurales porosidad, geometría, interconectividad porosa, área de superficie y tamaño del poro individual; existen diversos materiales utilizados para su fabricación que van desde materiales puramente sintéticos, a materiales naturales, cerámicas y sus combinaciones (43).

Alrededor de la década de 1990, Almazán Díaz y cols., realizaron un estudio con el objetivo de estudiar el efecto de colágena 1 polimerizada sobre la reparación de fracturas femorales de rata Wistar, para lo cual utilizaron un grupo control y un grupo testigo; realizaron procedimientos de osteotomía transversal en los que mediante estudios radiográficos realizados a los 16 días se observaron signos de consolidación ósea, estos estudios se correlacionaron con estudios histológicos e histoquímicos en los cuales se evaluó la presencia de osteopontina y osteonectina con el objetivo de determinar el grado de osificación durante los estadios de la reparación y que al finalizar el estudio, su alta expresión se relacionó con el uso de la colágena 1 polimerizada (44).

Arroyo y cols., desarrollaron una membrana compuesta con HA, PVA y PLA mediante una técnica de electrohilado, el objetivo de este estudio fue crear la membrana como andamio con aplicación en un modelo murino de fractura diafisaria para regeneración ósea obteniendo como resultado una membrana con propiedades de alta porosidad y ordenamiento heterogéneo; en la evaluación histológica se utilizaron tinciones de hematoxilina-eosina y tinción tricómica de

Masson, mediante el software orbit image analysis se midió de forma cuantitativa la deposición de colágeno; mediante el análisis histológico y la tomografía computarizada se concluyó que esta membrana tiene un efecto en la regeneración ósea por mostrar formación de cartilago hialino y elástico (2).

A su vez, Budiatin y cols., en el 2021 determinaron el efecto de los implantes óseos a base de hidroxiapatita bovina (BHA), gentamicina (GEN) y gelatina (GEL) sobre la regeneración de defectos óseos in vivo con ratas Wistar, el defecto óseo fue realizado con un trépano para darle la forma de orificio de 2,2 mm y 2 mm de profundidad en el fémur, mediante un examen radiológico se realizaron las evaluaciones del implante óseo, en el cual se concluyó que el implante combinado de BHA- GEN- GEL acelera la vascularización del tejido provocando una reparación acelerada de los defectos óseos, lo que le da la propiedad de ser un material biomédico potencial para el tratamiento en la osteomielitis (45).

La impresión de biomaterial 3D representa un método de fabricación altamente sugerido para la reparación de tejido óseo, esta técnica permite generar andamios específicos para sustituir el segmento óseo requerido por el paciente ofreciendo la ventaja de ser personalizado; un estudio realizado por Minto y cols., propuso el uso de un andamio conformado por poli (ácido L-láctico) e hidroxiapatita (HA), impreso en 3D, la metodología consistió en dividir tres grupos (grupo control, injerto óseo, grupo membrana); mediante evaluación radiográfica se observó menor formación de callo óseo en el grupo de andamio 3D ( $p = 0,0183$ ) a comparación del grupo injerto, por consiguiente, con los resultados obtenidos, el andamio demostró buena biocompatibilidad y caracterización anatómica al del radio (46).

El poli (ácido L- láctico) así como la policaprolactona (PCL) son biomateriales que han sido aplicados en andamios con el objetivo de evaluar regeneración ósea; es el estudio de Weng y cols. donde estudiaron con un diseño comparativo de andamios (PLLA/PLC y PLLA) la viabilidad del andamio en defecto óseos realizados en el cúbito de conejos, posteriormente con el empleo de examen de microtomografía de rayos X se evaluó la densidad mineral ósea formado, reflejando

entre el grupo A (PLLA) y grupo B (PLLA/PLC) una densidad de 1.25434 mg / cc y 1.32521 mg / cc respectivamente; el estudio concluyó que el andamio formado por PLLA/PCL es más adecuado para la regeneración ósea en comparación del andamio PLLA; Sin embargo, es el interés de este estudio mejorar la degradabilidad en aras de mejorar otras propiedades del andamio (47).

Actualmente existen estudios enfocados en proponer andamios con fármacos, es el estudio de Ji y cols., (48) donde proponen un andamio de quitosano/hidroxiapatita (CS/HA) cargado de ácido salvianólico B (Sa B), esta propuesta tiene por objetivo evaluar el comportamiento de liberación controlada por parte del fármaco y la bioactividad del andamio, para evaluar la reparación en defecto óseo, se realizaron osteotomías de radio en conejos de 1,5 cm de longitud y se colocaron andamios con y sin presencia del fármaco Sa B-CS / HA, CS/HA respectivamente; finalmente se evaluó la regeneración ósea mediante TC a las 6 semanas, donde se observó una relación de volumen óseo (BV / TV) significativamente mayor en comparación con el grupo control (29,6% vs 16,2% en BV / TV,  $p < 0,05$ ), de esta forma, estos resultados apoyan bioactividades osteogénicas y angiogénicas del andamio Sa B-CS / HA .

Para llevar a cabo la Ingeniería de tejido es necesario emplear varios materiales como andamios, por ende se mencionan algunas formas de producir los andamios tales como polímeros sintéticos y naturales o una combinación de ambos; Hassanajili y cols., realizaron un estudio donde con tecnología basada en impresión 3D fabricaron un andamio compuesto de ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PCL) e hidroxiapatita (HA), en el desarrollo de esta membrana evaluaron como objetivo principal la porosidad además de biocompatibilidad y osteoinducción, en este estudio se concluye que la membrana con PLA/PCL con 70/30 de contenido respectivamente en comparación con PLA/PCL de 50/50 y 30/70 logró resultados favorables de viabilidad y biocompatibilidad (49).

Dentro de las aplicaciones en la ingeniería de tejidos y en especial en el campo de la osteogénesis, existen materiales que actúan como una clase emergente de biomaterial y son los nanomateriales de arcilla natural; Wang y cols.

desarrollaron un andamio de atapulgita natural mediante una bioimpresora 3D, posteriormente, usando tinción de rojo de alizarina analizaron cuantitativamente la cantidad de calcio depositado comparando un grupo control con el grupo de nanoatapulgita, este último mostró un aumento en la cantidad de calcio depositado ( $1643 \pm 92,92 \mu\text{m}$ ) en comparación con las células cultivadas en el grupo de control ( $250,3 \pm 16,50 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0,001$ ) por lo tanto, en este estudio se confirmó la creación de un andamio de nanoatapulgita como candidato ideal para la osteogénesis y angiogénesis (50).

Usando biomateriales con propiedades que pueden inducir y apoyar la formación de tejido óseo, se menciona que el óxido de grafeno muestra propiedades que apoyan el crecimiento así como la proliferación celular, por lo que se han propuesto andamios a base de grafeno para aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejido óseo; un estudio realizado por Dinescu y col., reportó la citocompatibilidad del compuesto de quitosano con grafeno, se utilizaron diferentes porcentajes de grafeno (0,5 a 3%), posterior a la adición de las células madre de tejido adiposo humano los andamios pasaron a denominarse “bioconstructores” (BC) y en la evaluación de citocompatibilidad se confirmó que después de 4 días en cultivo, existió una diferencia estadísticamente significativa entre BC con 2 y 3% de peso en grafeno, lo que sugiere un efecto positivo sobre la proliferación de células (51).

Las fracturas abiertas que ocurren en la tibia llegan a ser resultado de un trauma de alta energía, el uso de autoinjerto para este tipo de fracturas está relacionado con complicaciones importantes y morbilidad en el sitio donante; Kuzyk y cols., realizaron un estudio para comparar la angiogénesis y la osteogénesis entre tratados con autoinjerto y grupos tratados con andamios de PLGA (copolímero de ácido poliláctico y ácido poliglicólico)/fosfato de calcio, se realizaron defectos diafisarios de 8.0 mm en tibias de caninos y mediante Micro CT, microscopía de campo brillante y microscopía fluorescente se analizaron las muestras y se concluyó presencia de formación ósea, así como formación de vasos sanguíneos significativamente mayores en muestras de andamios a las muestras de autoinjerto (52).

Las fracturas metafisarias son importantes por ser resultado de gran cantidad en pacientes traumáticos, en un estudio realizado por Na y cols., realizaron un estudio donde se propone un nuevo modelo para estudiar el proceso de curación de este tipo de fracturas en 18 conejos blancos, el modelo se creó dividiendo la meseta tibial con un osteótomo y se fijó con tornillos de compresión; mediante el uso de radiografía e imágenes se demostró que la curación de la fractura metafisaria fue un proceso de curación ósea directa a través de la formación de hueso (53).

Los defectos óseos, en especial los del hueso radial, han representado un desafío en los escenarios clínicos; debido a la excelente biocompatibilidad que muestran la fibroína de seda (SF), la nanohidroxiapatita (nHA) y el quitosano (CS), Ye y Cols., los proponen en conjunto como andamio para la ingeniería de tejido óseo, el estudio que realizaron se enfoca en la necesidad de investigar el mecanismo del andamio en conjunto y en la reparación de defectos óseos en conejos blancos; el modelo de defecto óseo se realizó en el hueso radial de aproximadamente 2 cm, se utilizando una hoja de sierra esterilizada, por medio de rayos X y observación histopatológica este estudio concluyó que el andamio compuesto por SF, nHA y CS muestra biocompatibilidad y osteoinducción, lo que permite proponerse como un andamio de reparación de defecto óseo (54).

A la fecha, no se cuenta con la realización de una membrana de hidroxiapatita con alcohol polivinílico y ácido poliláctico aplicada en una técnica de fractura en modelo estandarizado por lo que este proyecto suma a estos antecedentes relevancia y resultados basados en ingeniería de tejido óseo.

## CAPITULO 2

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La ingeniería de tejido óseo busca crear elementos artificiales que puedan inducir la formación de tejido óseo y que a su vez incluya activación de cascadas de señalización relacionados con el proceso osteogénico.

Las fracturas con pérdida de tejido son un problema común y que con frecuencia conducen a una pérdida de la función. Actualmente se intenta resolver el problema mediante el empleo de sustitutos óseos que faciliten el proceso de regeneración ósea, pero son muy costosos.

El empleo de la membrana compuesta de hidroxiapatita, alcohol polivinílico y ácido poliláctico es de un costo accesible y puede funcionar como un andamio para una regeneración ósea la cual, se puede reflejar mediante la evaluación de osificación por medio de un estudio histológico en fracturas de pérdida de tejido.

No se ha demostrado el efecto de esta membrana en fracturas con pérdida de tejido, por lo que nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Se induce regeneración ósea con el empleo de una membrana compuesta de hidroxiapatita, alcohol polivinílico y ácido poliláctico como andamio en una fractura con pérdida de tejido?

## **HIPÓTESIS**

El empleo de una membrana compuesta de hidroxiapatita con alcohol polivinílico y ácido poliláctico como andamio en una fractura con pérdida de tejido induce regeneración ósea.

## **JUSTIFICACIÓN**

Las lesiones relacionadas con los huesos y el retardo en la consolidación pueden resultar en complicaciones para una gran cantidad de personas, las alteraciones de la consolidación se incluyen dentro de los defectos locales de las fracturas que derivan de una mala estabilización y una escasa vascularización.

La aplicación clínica de la terapia de ingeniería de tejido óseo utilizando andamios, sigue enfrentando una serie de desafíos aun cuando existen una serie de avances e investigaciones en los últimos años. A nivel mundial, se ha reportado una incidencia anual de cerca de 15 millones de casos de fracturas entre las cuales hasta un 10 % presentan complicación por la falta de tejido.

Considerando el impacto de la falta de consolidación de fracturas y seguir evaluando desafíos que se enfrentan durante la ingeniería de tejido óseo, se busca mediante las nuevas técnicas de producción de fracturas y estrategias en la implementación de andamios recursos que logren una regeneración ósea exitosa, la cual, puede ser reflejada observando actividad celular mediante análisis histológico.

La siguiente investigación de tipo experimental se dirige a seguir líneas de trabajo relacionadas con regeneración ósea, para lo cual se emplea un estudio piloto que consiste en el uso de una membrana como andamio en fractura de modelo murino.

Los resultados nos permitirán evaluar y conocer la función del andamio propuesto, así como iniciar estudios de terapia que aborden el campo de la ingeniería de tejido óseo.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar en un estudio piloto el efecto de una membrana compuesta de hidroxiapatita con alcohol polivinílico y ácido poliláctico sobre la regeneración ósea en una fractura con pérdida de tejido.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Generar un modelo experimental de fractura estandarizado con pérdida de tejido en fémur de rata.
2. Adaptar una membrana compuesta de hidroxiapatita, alcohol polivinílico y ácido poliláctico en el defecto óseo de fractura generado.
3. Comparar a los 30 días en cortes histológicos cambios relacionados con la inducción de callo y el proceso de regeneración ósea entre el grupo control y el grupo experimental.

## **METODOLOGÍA**

### **DISEÑO DEL ESTUDIO**

El diseño del estudio es por el objetivo general comparativo, por la asignación de la maniobra experimental, por la dirección temporal longitudinal y por la recolección de datos homodémico.

### **REGISTRO DE PROTOCOLO**

El protocolo fue registrado con el número: 879 (anexo 1), autorizado por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP): con oficio VIEP/0424/2022 (anexo 2).

Los aspectos bioéticos se describen en el apartado de anexos (anexo 3) así como la logística del estudio (recursos humanos, materiales y financieros) (anexo 4)

### **UBICACIÓN ESPACIO-TIEMPO**

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Medicina Experimental, en el periodo comprendido de enero 2021 a agosto 2022.

### **MARCO MUESTRAL**

El universo de estudio se conformó por modelos murinos: ratas de la cepa Wistar. Para este estudio piloto se solicitó ante el bioterio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla 12 ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 250 a 300 g de peso. El tamaño de la muestra fue “a conveniencia” y el tipo de muestreo no probabilístico por ser un estudio piloto.

### **DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN**

Se utilizaron ratas macho, de la cepa Wistar, adultas con un peso de 250 a 300 g.

### **CRITERIOS DE SELECCIÓN**

#### *CRITERIOS DE INCLUSIÓN*

Ratas macho de la cepa Wistar, sanas, con un peso de 250-300 g de peso al inicio del estudio.

#### *CRITERIOS DE EXCLUSIÓN*

Ratas que no tengan el tamaño o la edad para la cirugía.

**CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

Ratas que presenten infección, algún problema en la etapa experimental o que mueran durante el procedimiento.

**DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES Y ESCALA DE MEDICIÓN**

Variable dependiente: Número de Condrocitos.

Variable independiente: Tratamiento (membrana compuesta de HA con PVA y PLA; la definición de las variables y la escala de medición se muestra en el apartado de anexos (anexo 5).

**TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS**

*Preparación en técnicas y procedimientos:*

Se realizaron cursos para la elaboración del siguiente protocolo, siendo en primera instancia el registro del protocolo, *Oficio No SIEP / C.I. / 123 / 2022*.

Seguido a este, la capacitación en el curso de manejo de animales con su respectiva evaluación y aprobación.

*Técnica de procedimiento de elaboración de membrana compuesta de HA PVA y PLA:*

A continuación, se describe el material, equipo y métodos utilizados para la elaboración de una membrana compuesta de HA, PVA y PLA (**Tabla 2**).

**Tabla 1.** Material y métodos empleados en la elaboración de membrana compuesta (HA PVA y PLA)

MATERIAL	EQUIPOS	REACTIVOS
AGITADOR ELECTROMAGNÉTICO (THERMOLYNE)	EQUIPO DE ELECTROHILADO	PLA
MATRAZ (50ml)		PVA
VASO DE PRECIPITADO	FUENTE DE ENERGÍA 20(kW)	HIDROXIAPATITA
MORTERO Y PISTILO		CLOROFORMO
PROBETA GRADUADA (50ml)		AGUA BIDESTILADA
JERINGAS (15, 20 ml)		
EQUIPO DE VENOCCLISIS		

La obtención de la membrana se realizó con un equipo de electrohilado. Los procedimientos previos a la obtención de la membrana comienzan con la preparación de soluciones.

Para la solución de ácido poliláctico, se mezcló 1 gramo de ácido poliláctico con 30ml de cloroformo. Posteriormente se colocó en el agitador electromagnético (Thermolyne) por 1 hora y 30 minutos (**Figura 2a**).

Para la solución de alcohol polivinílico, se mezclaron 3 gr de hidroxapatita, 3gr de alcohol polivinílico y 30 ml de agua bidestilada. Esta mezcla se colocó en el agitador electromagnético por 3 horas (**Figura 2a**).

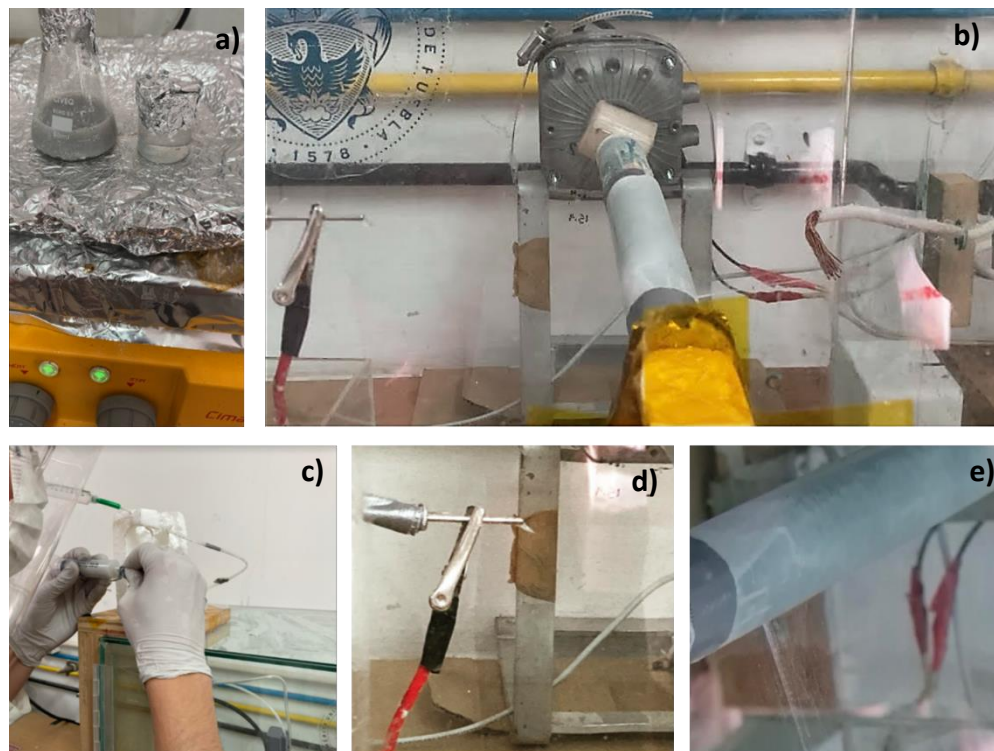
Posterior a la obtención de estas soluciones se procedió a preparar el equipo de electrohilado el cual está conformado por un cable de tierra, un potenciador y un motor (**Figura 2b**).

Se procedió a colocar la mezcla de PVA en una jeringa estéril de 20 ml y la mezcla de PLA en una jeringa estéril de 15 ml para posteriormente conectarlas en un equipo de venoclisis (**Figura 2c**)

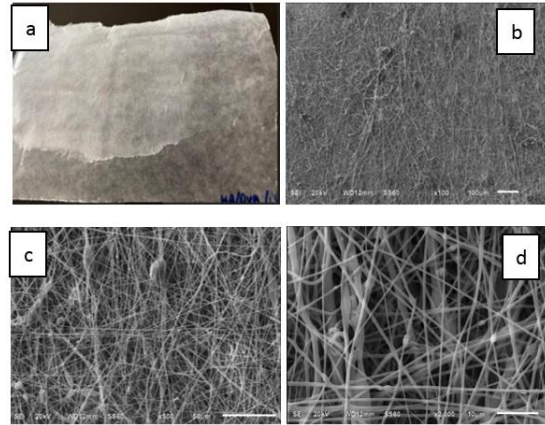
La impresión de la membrana se generó por la inyección de los polímeros, creando una gota homogénea al final de la conexión de venoclisis conectado a un pivote con un potenciador de energía a 20 kW (**Figura 2d**).

Posteriormente, el hilado generado a partir de la gota conectado a un potenciador de fuerzas eléctricas a 20 kW creó la deposición de fibras poliméricas sobre un colector de fibras (papel encerado) (**Figura 2e**).

Finalmente se retiró el papel encerado del tubo giratorio que conecta al motor y se pudo observar la membrana compuesta de PVA, PLA e HA de la cual se obtuvo una foto por microscopía óptica (**Figura 3a**), así como imágenes mediante SEM con una magnificación de 100x (**Figura 3b**), 500x (**Figura 3c**) y 2000x (**Figura 3d**).



**Figura 2.** Etapas del proceso de producción de membrana compuesta. a) solución de ácido poliláctico y alcohol polivinílico en agitador electromagnético. b) Equipo de electrohilado. c) Conexión de venoclisis recibiendo mezcla de PVA y PLA. d) Gota homogénea obtenida del equipo de venoclisis con un potenciador de energía a 20 kW. e) Hilado generado por deposición de fibras poliméricas.



**Figura 3.** Visualización de membrana de HA, PVA y PLA por microscopía óptica y SEM. a) Imagen tomada por microscopía óptica. b) Imagen obtenida mediante SEM con magnificación de 100X. c) Imagen obtenida mediante SEM con magnificación de 500X. d) Imagen obtenida mediante SEM con magnificación de 2000X.

#### *Manejo y cuidado de los animales:*

Para este estudio piloto se obtuvieron ante el bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla 12 ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 250 a 300 gr de peso. La cantidad de ratas se adaptaron a las etapas del presente estudio (2).

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité de uso y cuidado animal de la facultad de medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

El manejo, mantenimiento y sacrificio de los animales se realizó en apego a la norma NOM-062- ZOO-1999 (Gobierno de México) esta norma establece las especificaciones técnicas que deben cumplir las personas físicas o morales relacionadas en todos los campos con este tipo de animales. Del mismo modo, se siguieron las normas en las que se basan los principios éticos en la investigación con los animales.

Para llevar a cabo el proyecto, la persona responsable tomó el curso de manejo de animales (anexo 6), que es impartido por el bioterio. Las ratas proporcionadas por el bioterio se mantuvieron bajo condiciones del medio ambiente controladas,

condiciones de higiene, exposición a ciclos de luz-oscuridad de 12 hrs con consumo de alimento *ad libitum* suministrado por el bioterio antes mencionado.

## **METODOLOGÍA PARA CADA OBJETIVO ESPECÍFICO**

**Objetivo específico 1:** Generar un modelo experimental de fractura estandarizado con pérdida de tejido en fémur de rata.

**Fundamento:** El proceso de producción de fracturas se ha estudiado desde hace tiempo, Yuehuei (56) menciona la necesidad de realizar métodos estándar para producir fracturas con la característica de ser comparables, por lo cual se utilizó un modelo de fractura sin tejido con la colocación de un alambre Kirschner.

Generar un modelo de fractura en modelos murinos, es un proceso que se ha realizado para observar y describir características histopatológicas en el proceso de regeneración ósea. A partir del conocimiento de sitios anatómicos y del uso de metodología empleada anteriormente por Rodrigues y cols. (57) para acceder a la diáfisis del fémur, se creó un modelo experimental de fractura estandarizado con pérdida de tejido en fémur de rata.

**Fase pre-operatoria:** Cada rata se colocó con sujeción de la base de la cola en una báscula, posteriormente con el conocimiento del peso se procedió a calcular la dosis para administración oral de analgésico Meloxicam 2 días previos a la cirugía, para el día del procedimiento se utilizó para anestésiar Ketamina-Xilacina con una técnica de administración intraperitoneal en base a la fórmula 0.20 ml / 100 grs. P.V.

Posterior a presentar estado de inconsciencia, se rasuró la pata izquierda.

**Fase operatoria:** El procedimiento quirúrgico se realizó en condiciones estériles. Bajo anestesia se realizó rasurado de la pierna izquierda y previa antisepsia se realizó incisión longitudinal en piel y se procedió a separar los músculos con la ayuda de separadores hasta exponer el hueso. Posteriormente con el empleo de una fresa de bola de baja velocidad del número 4 se delimitó una fractura de aproximadamente 1 mm y se realizó una fractura transversal en la diáfisis del fémur, posteriormente se continuó con la fijación intramedular de la porción proximal y

distal de la fractura con un clavo de Kirschner de (1.20 mm de diámetro), con el objetivo de fijar y hacer coincidir los dos extremos de la fractura.

***Fase post-operatoria:***

Posteriormente se procedió a suturar músculos y piel y se colocó antibiótico y analgésico de manera tópica en la zona. Se administró analgésico vía oral, antibiótico (Enrofloxacin 0.10 ml /100 grs P.V.) evitando así algún tipo de infección y dolor.

***Metodología:*** Esta etapa empleó 6 biomodelos con el objetivo de estandarizar la técnica.

**Objetivo específico 2:** Adaptar una membrana compuesta de hidroxiapatita, alcohol polivinílico y ácido poliláctico en el defecto óseo de fractura generado.

***Fundamento:*** Dentro de las características de un andamio, existen propiedades mecánicas como rigidez de la matriz, el ancho de la fibra y la porosidad, estas propiedades han demostrado un papel importante en la diferenciación celular. Los andamios al seguir una geometría y flexibilidad inicial permiten respetar y mantener fenotipos celulares apropiados y ventajas para una regeneración ósea (24).

***Metodología:*** Una vez que se demostró un modelo de fractura con pérdida de tejido viable, se repitió la producción del modelo de fractura previamente estandarizado, pero esta vez colocando una membrana como andamio. Se empleó un grupo control y un grupo con tratamiento como se puede visualizar en el cuadro 1.

**Cuadro 1. Distribución de los grupos: control /membrana compuesta de hidroxiapatita con polivinil alcohol y ácido poliláctico**

GRUPO CONTROL	GRUPO CON TRATAMIENTO
	Tratamiento con membrana
Control Fractura de tibia + Colocación de alambre tipo Kirschner	Fractura de tibia +colocación de alambre kirschner + membrana compuesta de hidro- xiapatita con polivinil alcohol y ácido poliláctico
No. De ratas 3	No. De ratas 3

### ***Técnica***

Grupo Control: A 3 biomodelos se les aplicó la metodología del objetivo 1.

Grupo con tratamiento: A cada biomodelo se le realizó fractura en el fémur, se colocó un alambre tipo Kirschner del extremo proximal a distal de la fractura y el espacio con pérdida de tejido recibió una membrana compuesta de HA, PVA y PLA previamente esterilizada con irradiación UV durante 90 minutos. El grosor de la membrana se adaptó al alambre de Kirschner, finalmente se procedió a suturar.

**Objetivo específico 3:** Comparar a los 30 días en cortes histológicos cambios relacionados con la inducción de callo y el proceso de regeneración ósea entre el grupo control y el grupo experimental.

**Fundamento:** Los métodos de preparación de tejido con tinción de hematoxilina – eosina y Tricrómico de Masson son de las muestras que más comúnmente se estudian; En el primer tipo de tinción su fundamento se basa para exponer características estructurales de los cortes (8) y para el segundo resulta funcional para estudios relacionados con la ingeniería de tejido ósea.

**Metodología:** Empleando técnicas histológicas se observaron, analizaron y compararon componentes relacionados con la regeneración ósea.

### ***Preparación de cortes histológicos***

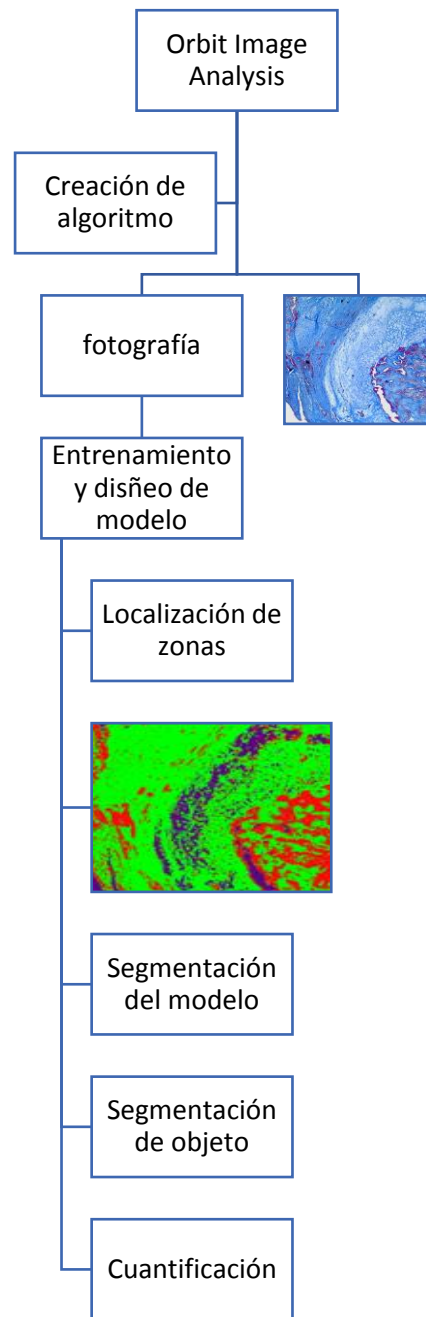
Después de realizar la fractura con el método estandarizado, se sacrificaron las ratas a los 30 días , se extrajo cada fémur , se diseccionó el tejido óseo sometiendo a fijación con formalina diluida 1:10 neutralizada , posteriormente se descalcificaron en HCl al 10% ; la sección del área de reparación fue 1cm arriba y abajo del lecho de la fractura (zona normal), con inclusión en parafina, se practicaron cortes longitudinales del tejido óseo y de los tejidos blandos analizando la celularidad del callo óseo, en el periostio y en los tejidos adyacentes se realizó tinción con tinción Tricrómica de Masson.

### ***Análisis de cortes histológicos***

Se realizó el análisis de los cortes histológicos por un médico experto en anatomía patológica.

### ***Determinación de osificación***

Se realizó un algoritmo en el software Orbit Image Analysis para poder cuantificar los condrocitos en el tejido (**Figura 4**).

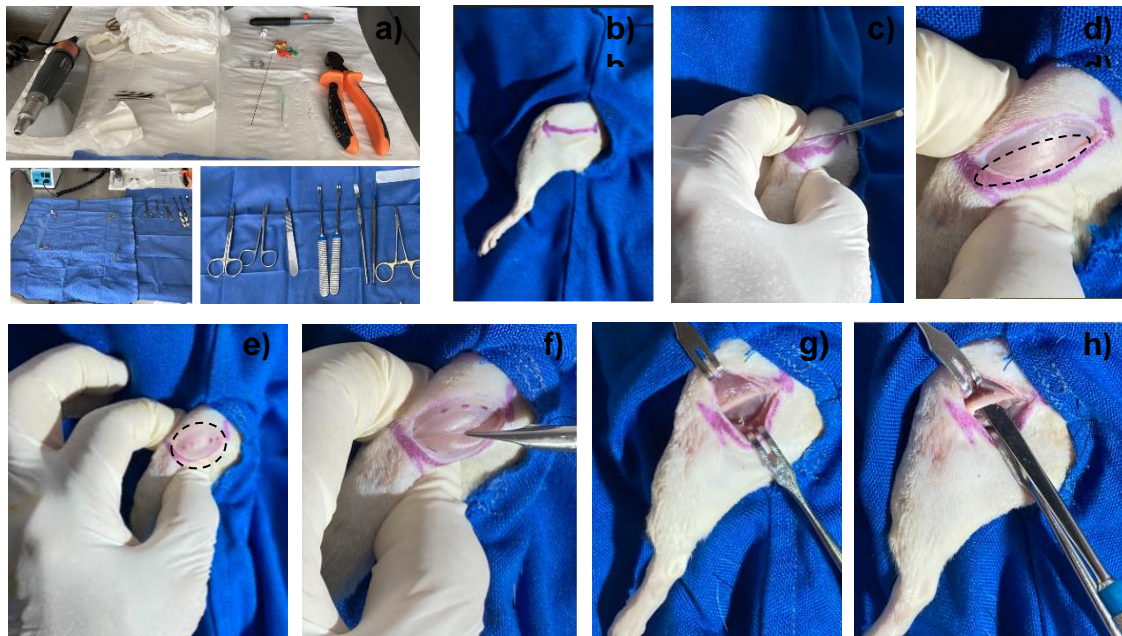


**Figura 4.** Proceso de cuantificación de condrocitos en el Software Orbit Image Analysis

## RESULTADOS

### CREACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE FRACTURA ESTANDARIZADO CON PÉRDIDA DE TEJIDO EN FÉMUR DE RATA

A continuación, con base en Rodrigues y cols. (57) se describe en las siguientes imágenes la secuencia realizada para realizar incisión hasta llegar a la exposición y separación de fémur en un modelo *post mortem*. Se inició con la preparación del instrumental y material a ocupar (**Figura 5a**), posteriormente se aisló con un campo estéril la extremidad inferior izquierda y se realizó un marcaje con un plumón en el sitio anatómico del fémur (**Figura 5b**), se procedió a realizar la incisión de la epidermis (**Figura 5c**). Posterior a realizar la incisión, se observó la exposición del tabique intermuscular (**Figura 5d**), mismo que se le realizó un marcaje (**Figura 5e**) para realizar disección (**Figura 5f**). Seguido de la separación de los músculos (tensor de la fascia lata y bíceps femoral) se observó el hueso fémur (**Figura 5g**) y finalmente se procedió a realizar la separación de la diáfisis respecto a los músculos con separadores (**Figura 5h**).



**Figura 5.** Cirugía en modelo post mortem de rata Wistar para exposición de fémur. a) Campo operatorio e instrumental utilizado en cirugía. b) Aislamiento de la extremidad inferior izquierda. c) Incisión de la epidermis. d) Visualización del tabique intermuscular. e) Marcaje sobre tabique intermuscular. f) Disección muscular. g) Visualización del hueso fémur. h) separación del hueso fémur.

Para la práctica *in vivo* de la estandarización de fractura en fémur de rata (cepa Wistar) se utilizaron materiales y métodos que se describen en la **Tabla 2**.

Los datos de los biomodelos se encuentran en el anexo 7 (**Tabla 3**).

**Tabla 2.** Material y equipo en práctica para estandarización de fractura en fémur de rata (cepa Wistar)

MATERIAL	EQUIPOS
SOLUCIÓN YODO ESPUMA	RASURADORA
AGUA INYECTABLE SOLUCIÓN ESTÉTIL	MICROMOTOR MDC DENTAL III
RECIPIENTE PLÁSTICO	
TABLA MADERA - CORCHO DESECHABLES	
COMPRESA QUIRÚRGICA	
CALIBRADOR VERNIER	
ALAMBRE DE CERCLAJE	
CLAVO DE KIRSCHNER 1.20 mm	
FRESA DE BOLA # 4	
CORTADOR DE ALAMBRE	
MANGO DE BISTURÍ No. 3	
HOJA DE BISTURÍ No. 15	
RETRACTOR SENN	
PINZAS DE CURACIÓN	
SUTURA NYLON 4-0	

A continuación, se describe en las siguientes imágenes la secuencia realizada para realizar el objetivo 1 *in vivo*, desde antisepsia hasta sutura de la epidermis. Se inició con preparación del área de antisepsia (**Figura 6a**), después se lavaron las extremidades inferiores con solución benzal (**Figura 6b**) y seguido a esto,

se secaron ambas extremidades (**Figura 6c**). Posteriormente se llevó a cabo la técnica de incisión y separación de diáfisis de hueso fémur antes mencionada, se realizó marcaje de perforaciones y línea de fractura (**Figura 6d**), una vez realizado el marcaje se procedió a realizar: perforaciones para alambre de cerclaje (**Figura 6e**), defecto de fractura con pérdida de tejido, entrada de alambre de cerclaje en perforación del extremo distal (**Figura 6f**), unión de alambre de cerclaje al extremo proximal (**Figura 6g**), cerclaje de ambos extremos (**Figura 6h**), sutura en capa muscular (**Figura 6i**) y finalmente sutura en epidermis (**Figura 6j**).



**Figura 6.** Cirugía de modelo de fractura con pérdida de tejido en hueso fémur. a) Área de antisepsia. b) Lavado de extremidades con solución benzal. c) Secado de extremidades. d) Marcas de perforación y línea de fractura. e) Perforaciones para alambre de cerclaje. f) Alambre de cerclaje en perforación distal. g) Unión de los extremos de fractura. h) Unión y corte del alambre de cerclaje. i) Sutura de músculos. j) Sutura de epidermis.

Posterior a los dos días del procedimiento quirúrgico se encontró una baja del biomodelo R2E\_DLT, por lo que se procedió a realizar una necropsia en colaboración con un veterinario experto en pequeñas especies, mismo que hizo constar que la causa de fallecimiento fue obstrucción intestinal y ulceración hepática Anexo 8 (**Figura 7a y 7b**).

Con base en la valoración del médico veterinario, se tomó la decisión de realizar cambios a la administración de analgésico Ketoprofeno por Meloxicam con una dosis de 1mg/kg en los siguientes procedimientos; Del mismo modo, se añadió el uso de probióticos mediante administración vía oral.

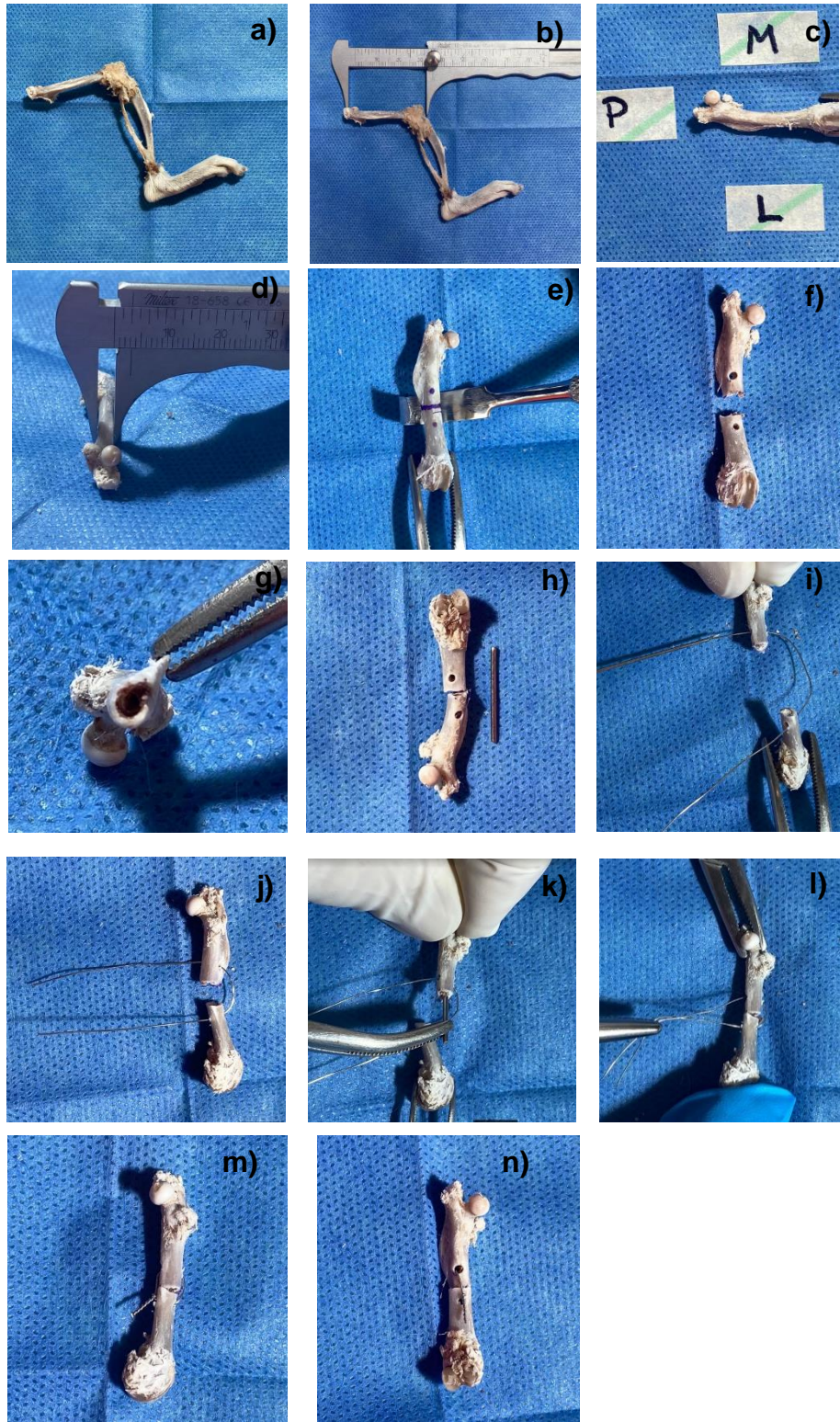
En el seguimiento de esta etapa, se utilizaron 2 biomodelos de los cuales describe en el anexo 7 (**Tabla 4**) sus respectivos datos.

Esta vez no existió mortalidad; sin embargo, cuando se tomó una radiografía al día 6 de la cirugía, se observó movilidad del clavo de Kirschner en ambos biomodelos, por lo que se procedió a realizar un segundo análisis *post mortem* valorando: hueso fémur (anatomía y longitud), clavo Kirschner (longitud y diámetro) y alineación de extremidad proximal y distal mediante alambre de cerclaje.

A continuación, se describe el procedimiento de estudio de fémur en pata derecha del biomodelo R4E\_DLT. Se inició con la disección de la extremidad (**Figura 8a**), posteriormente se midió con un vernier la longitud del hueso fémur (**Figura 8b**) y posteriormente desarticulado se visualizaron las caras medial, proximal y lateral de este (**Figura 8c**).

Posteriormente se midió con un vernier el diámetro de la diáfisis del fémur (**Figura 8d**), se marcaron las perforaciones para el alambre de cerclaje y fractura (**Figura 8e**), se realizó la fractura quedando el extremo proximal y distal (**Figura 8f**) y se observó el canal medular mediante una vista medial (**Figura 8g**).

Seguidamente se visualizó: el hueso fémur con el clavo de Kirschner (**Figura 8h**), la inserción del alambre de cerclaje en las perforaciones (**Figura 8i, Figura 8j**), Inserción intramedular del clavo Kirschner (**Figura 8k**) alineación y cerclaje de extremidades (**Figura 8l**), corte del alambre de cerclaje (**Figura 8m**) para terminar con la presentación de hueso fémur con fractura, clavo y cerclaje (**Figura 8n**).



**Figura 8.** Imagen representativa del procedimiento quirúrgico de modelo de fractura con pérdida de tejido en disección de hueso fémur de rata Wistar. a) Extremidad inferior derecha de Rata Wistar. b) Medición de longitud del hueso fémur. c) Caras medial, proximal y lateral del hueso fémur. d) Medición del diámetro del fémur con calibre vernier. e) Trazos en diáfisis de fémur, representando sitios de perforación para alambre de cerclaje y trazo de línea de fractura. f) Perforaciones y línea de fractura realizadas. g) Vista transversal del hueso posterior a la fractura. h) Vista del hueso y del clavo de Kirschner. i) Inserción del alambre de cerclaje en las dos extremidades. j) Acercamiento de las dos extremidades. k) inserción del clavo de Kirschner en el canal medular. l) Unión de extremidades del alambre de cerclaje. m) Fémur con alambre de cerclaje. n) Vista de alambre de cerclaje con perforaciones.

Posterior al análisis del hueso fémur, se utilizaron 3 biomodelos de los cuales no reflejaron cambio de peso o lesiones en tejidos. Mediante radiografía tomada a los 6 días post-operatorios se observó estabilidad del clavo intramedular y se confirmó la creación de un modelo de fractura con pérdida de tejido en fémur de rata Wistar **Figura 9**. Se describen en el anexo 7 (**Tabla 5**) los datos del procedimiento quirúrgico del grupo control.

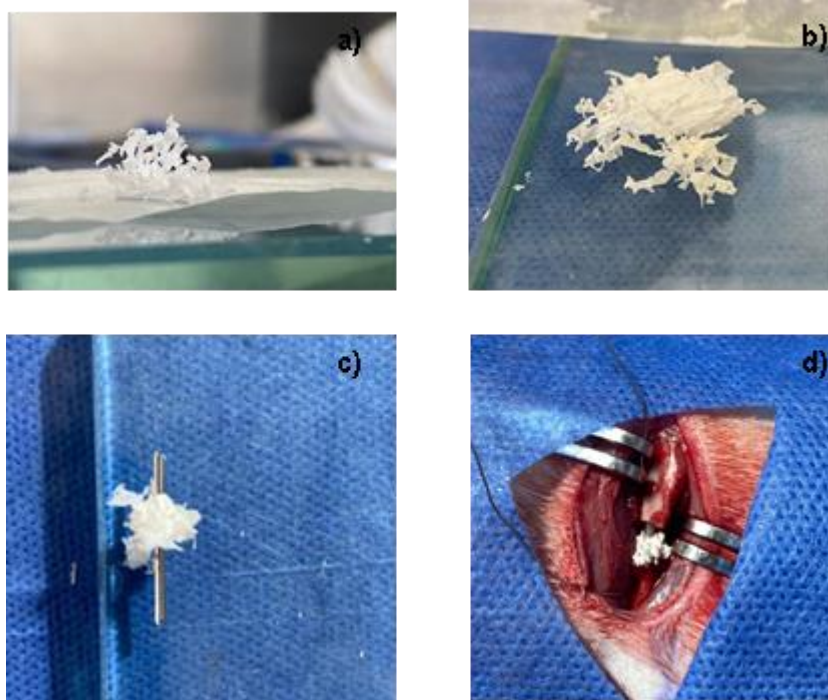


**Figura 9.** Radiografía de modelo de fractura con pérdida de tejido en fémur de rata Wistar.

### **ADAPTACIÓN DE UNA MEMBRANA COMPUESTA DE HIDROXIAPATITA, ALCOHOL POLIVINÍLICO Y ÁCIDO POLILÁCTICO EN EL DEFECTO ÓSEO DE FRACTURA GENERADO.**

Al demostrarse viable el modelo de fractura con pérdida de tejido, se adaptó en 3 biomodelos la membrana compuesta con HA, PLA y PVA. Se describen en el anexo 7 (**Tabla 6**) los datos del procedimiento quirúrgico del grupo experimental. A

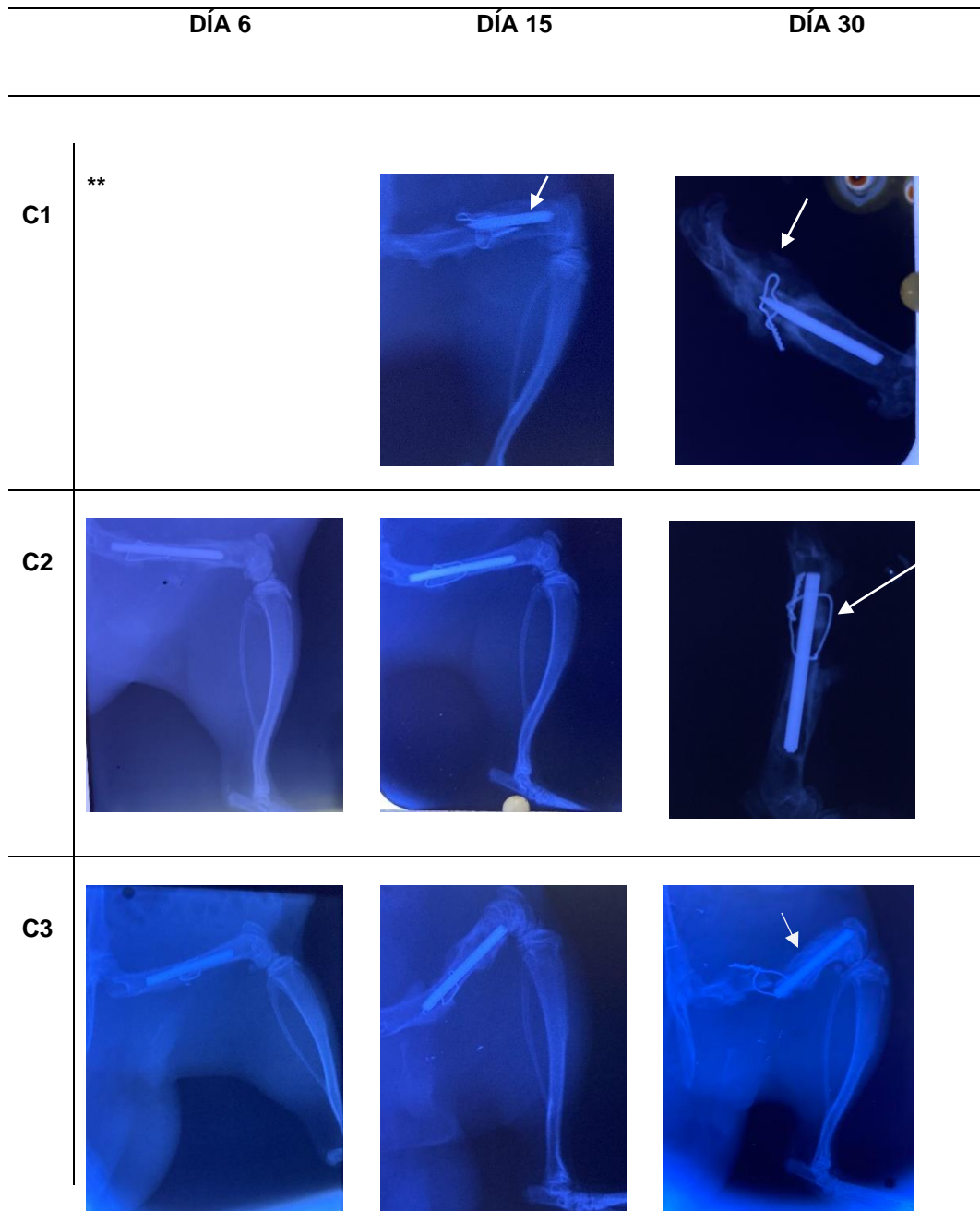
continuación, se describe en las siguientes imágenes la secuencia llevada a cabo para realizar el objetivo 2, se describe la técnica utilizada para la utilización de membrana. Se inició esta etapa separando la membrana del papel encerado (**Figura 10a**), esto fue factible con el uso de una espátula de metal 7a (material odontológico) posteriormente se colocó en una loseta de vidrio estéril (**Figura 10b**), se adaptó en el clavo Kirschner en su parte central (**Figura 10c**) y finalmente fue llevado a la cavidad medular del hueso fémur (**Figura 10d**).



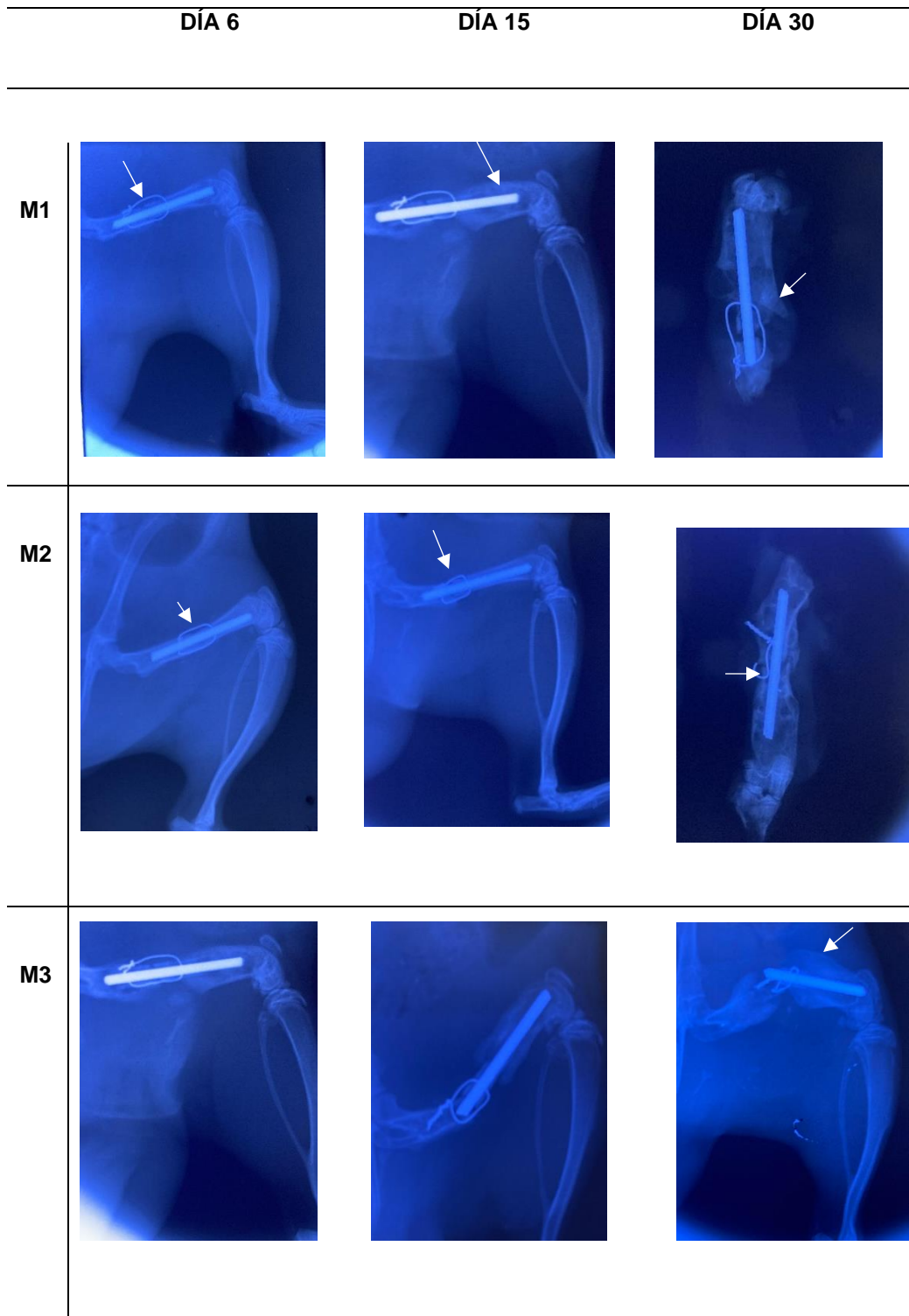
**Figura 10.** Adaptación de membrana compuesta de HA, PVA y PLA sobre modelo de fractura estandarizado. a) Separación de membrana del papel encerado. b) Membrana compuesta. c) Membrana adaptada al centro del clavo de Kirschner. d) Adaptación del clavo con membrana en el canal medular del fémur.

## EVALUACIÓN RADIOLÓGICA

Para la evaluación radiológica se tomaron radiografías en posición antero-posterior de la extremidad izquierda a los 6, 15 y 30 días.



**Figura 11.** Evaluación radiográfica del grupo control a los 6, 15 y 30 días. \*\* **C1** Radiografía ausente a los 6 días. **C1** día 15, se observa desplazamiento del clavo hacia el extremo distal de la fractura (flecha blanca), día 30 existe una zona radiopaca irregular en el sitio de fractura (flechas blancas). **C2** se puede observar a los 6 y 15 días una zona radiolúcida muy delgada que indica el sitio de fractura, día 30 se observa una zona radiopaca en el sitio de fractura (flechas blancas). **C3** zona radiopaca en el extremo distal de la fractura (flecha blanca).



**Figura 12.** Evaluación radiológica del grupo experimental (membrana) a los 6, 15 y 30 días. **M1** día 6 se observa una zona radiolúcida que representa el sitio de fractura (flecha blanca), día 15 existe una zona radiopaca en el periostio de la parte distal de la fractura (flecha blanca), día 30 zona radiopaca con un grosor más evidente en el borde de la fractura (flecha blanca). **M2** día 6 zona delgada radiolúcida indicando sitio de fractura (flecha blanca), día 15, zona radiolúcida casi imperceptible del sitio de fractura, día 30 se puede observar una zona radiopaca continua en el sitio de fractura (flecha blanca). **M3** zona radiopaca en el extremo distal de la fractura (flecha blanca).

El procedimiento de análisis se realizó por un radiólogo experto cegado al estudio y a los procedimientos, con ayuda de un observador que era el único que conocía el grupo control y el grupo experimental. El radiólogo describió un grupo con mayor actividad perióstica, lo refirió como un callo más evidente (más radiopaco) a comparación del otro grupo del cual menciono que era menos visible. El radiólogo determinó mayor actividad del periostio en el grupo que se colocó la membrana como andamio.

Además del análisis por un radiólogo experto, se realizó la medición de longitud del callo con el software Fiji/Image J (herramienta para el procesado y análisis de imágenes digitales) para el control 1 y 2 y para los biomodelos experimentales 1 y 2 por ser biomodelos que mantuvieron el clavo de Kirschner estable.

**Tabla 7.** Medición de longitud de callo óseo

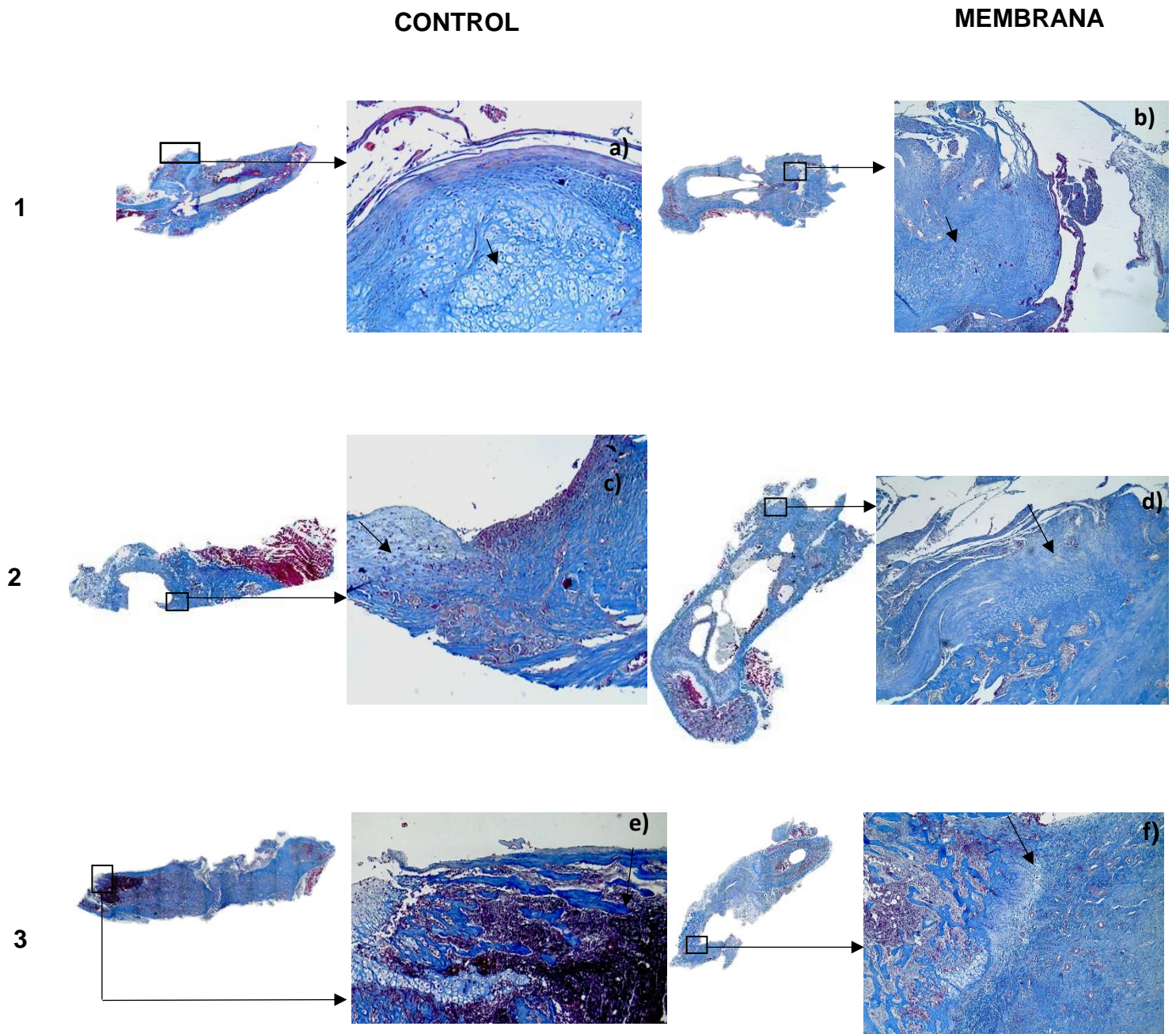
<b>Biomodelo</b>	<b>Control longitud (mm)</b>	<b>Membrana longitud (mm)</b>
1	8.000	8.852
2	4.370	5.386
total	12.37	14.23

## **COMPARACIÓN EN CORTES HISTOLÓGICOS CAMBIOS RELACIONADOS CON EL PROCESO DE REGENERACIÓN ENTRE EL GRUPO CONTROL Y EL GRUPO EXPERIMENTAL.**

### **ANÁLISIS DE CORTES HISTOLÓGICOS**

Las secciones histológicas fueron evaluadas por un especialista en anatomía patológica quien describió microscópicamente el grupo control y el grupo experimental.

En la descripción se mencionó para el grupo control presencia de células madre cartilaginosas con mitosis asimétricas, proceso poco visible para el grupo experimental donde se observó abundante tejido conectivo con columnas de osteoblastos en proceso de formación a osteocitos y escasos condroblastos.



**Figura 13.** Microfotografías de cortes histológicos. a) La flecha señala condrocitos hipertróficos, cada uno con su laguna correspondiente avanzando del periostio. b) Se señalan escasos condrocitos en una fase no hipertrófica. c) Se señala la zona de fractura, específicamente rodeada de periostio donde se observan células madre mesenquimatosas. d) Se observa una columna de condrocitos emergiendo del periostio avanzando hacia el sitio de la fractura. e) En esta microfotografía se puede observar en un color morado fragmentos de hueso necrótico con respuesta inflamatoria. f) La flecha señala una columna de condrocitos avanzando hacia el sitio de fractura.

## DETERMINACIÓN DE OSIFICACIÓN

La cantidad de osificación se midió cuantitativamente con el software Orbit (Tabla 8). Se puede apreciar que, cuando se la membrana, la cantidad de condrocitos medidos con este método es aproximadamente el doble que en el control.

**Tabla 8.** Análisis descriptivo de las laminillas analizadas con el software Orbit Image Analysis

Biomodelo	1	2	3	Promedio $\pm$ DE
<b>CONTROL</b>	* 68,067	40,358	36,613	<b>48,346 <math>\pm</math> 17,181</b>
<b>EXPERIMENTAL (MEMBRANA)</b>	*102,500	56,062	100,097	<b>86, 219 <math>\pm</math> 26,144</b>

\* Suma de condrocitos cuantificados en los cortes histológicos evaluados con microfotografías con el programa Orbit

## DISCUSIÓN

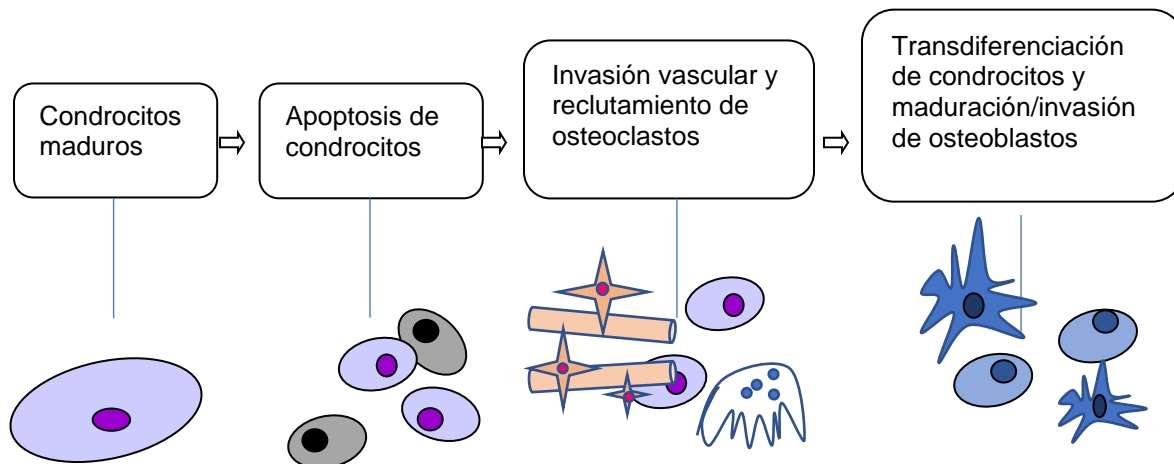
La ingeniería de tejido óseo es una alternativa terapéutica en comparación con las terapias convencionales que utilizan injertos que busca mediante andamios inducir la regeneración del tejido óseo lesionado con cascadas de señalización que estén involucradas con la remodelación ósea. Existen diferentes modelos de fractura que permite evaluar las propiedades que ofrece el andamio, y es el caso de los huesos largos donde comúnmente se aplican (44)(45)(47)(48). Sin embargo, la metodología del modelo no es explícita o estandarizada, lo que puede impedir desafíos en su reproducibilidad.

La primera fase de este estudio consistió en estandarizar un modelo de fractura. Para las primeras ratas Wistar se insertó un clavo de 0.35 mm de diámetro, este diámetro ha sido reportado anteriormente para unir parte proximal y distal en fractura diafisaria de fémur(58). Para evaluar la estabilidad del clavo dentro del canal medular se utilizó rayos X a los 6 días. No obstante, se observó movilidad del clavo del canal medular. Por lo que se realizó un análisis específico del hueso fémur y de la técnica. Las modificaciones para las siguientes cirugías se basaron en la morfología del hueso fémur, en el diámetro del canal medular y el alambre de cerclaje. Posterior a este análisis se propuso utilizar la parte más distal a la línea áspera que presenta el hueso, un diámetro de 1.20 mm para el clavo de Kirschner, así como perforaciones distales a la línea de fractura. Los resultados de rayos X a los 6 días indicaron una exitosa estabilidad del clavo en el canal medular.

Para la segunda etapa, al demostrarse viable nuestro modelo de fractura, se obtuvieron con un total 2 grupos de 6 ratas, el grupo 1 como control con 3 ratas y el grupo 2 como grupo experimental con 3 ratas que ocupó la membrana de HA, PVA y PLA como andamio.

Los resultados de rayos X a los 30 días reflejaron para el grupo experimental mayor zona radiopaca en la periferia de la fractura. Esta longitud se midió con el software de procesamiento de imágenes fiji donde se obtuvo un área de 14.23 mm para el grupo experimental y un área de 12.37 mm para el grupo control.

Aunque en ambos grupos no existió un cierre total de la fractura por hueso nuevo, los resultados en los cortes histológicos confirmaron para ambos grupos una osificación endocondral; sin embargo, el depósito de hueso trabecular maduro fue más evidente en el grupo de ratas con membrana que en grupo control, lo cual se confirmó con el análisis radiográfico a los 30 días. Esto se puede justificar con las diferentes fases de desarrollo que presentan los condrocitos, mismos que al presentar transdiferenciación, reflejan un hueso maduro como se mencionó anteriormente (**Figura 15**).



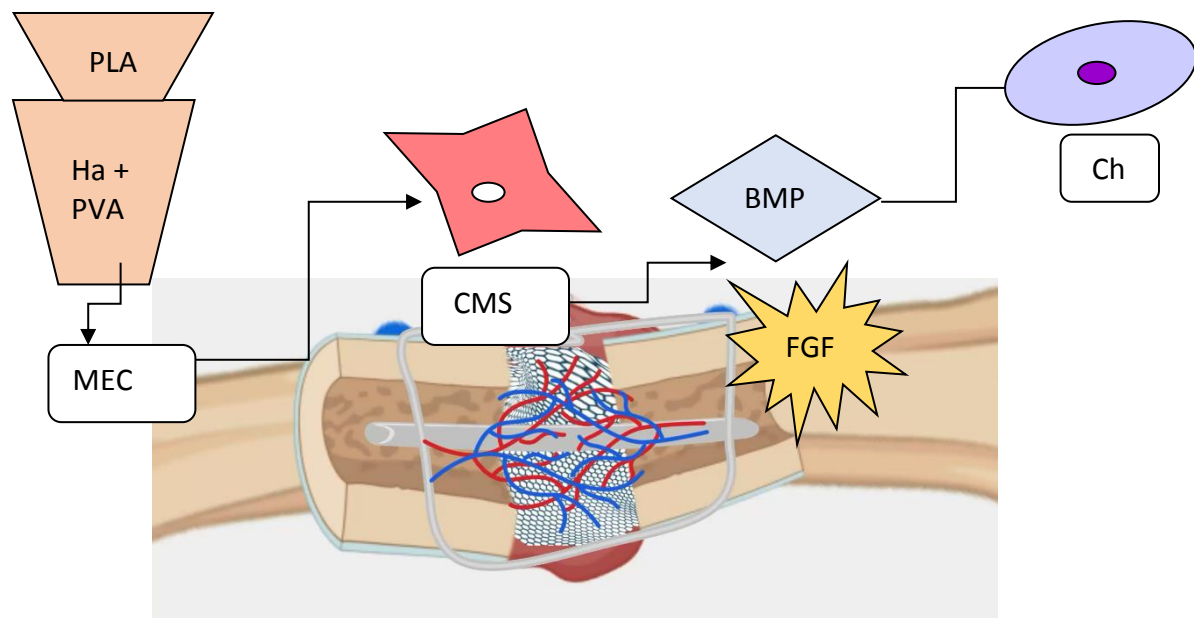
**Figura 14.** Vista esquemática de la invasión celular y comportamiento durante el desarrollo de la osificación endocondral. Tomado de Knuth y cols. (59). Posterior al establecimiento de la plantilla de cartílago, un grupo de condrocitos hipertróficos entra a fase de apoptosis, lo que permite espacio para que la vasculatura invada y libere moléculas bioactivas dentro de la MEC. Simultáneamente preosteoblastos adheridos al costado de la vasculatura la invaden por migración pasiva. Los factores liberados por la MEC promueven aún más el reclutamiento de osteoclastos en la remodelación de la MEC. Los condrocitos que no entran a fase de apoptosis dentro de la matriz son capaces de transdiferenciarse en células similares a osteoblastos que en conjunto con osteoblastos maduros contribuyen a la formación ósea.

Se pudo observar una mayor presencia de actividad celular en la zona por el grupo experimental la cual se refleja como tejido conectivo denso irregular y que se forma a partir del periostio o del hueso preformado del borde de la fractura, esto sugiere la formación de condrocitos.

Esta característica densa e irregular se puede explicar de la siguiente manera:

La fractura con pérdida de tejido involucra estímulos mecánicos de los osteocitos que se encuentran dentro de la matriz ósea. Las membranas de los osteocitos presentan prolongaciones las cuales están en una relación íntima con las paredes canaliculares, que en conjunto parecen efectuar una función mecanosensible en los osteocitos, mismos que al detectar un flujo de fluidos por fuerza de carga de tipo mecánico influyen en la comunicación entre células. Aunado a esto su ubicación dentro de la matriz ósea promueven la transducción de estímulos mecánicos en señales bioquímicas, fenómeno denominado efecto piezoeléctrico (3).

Cuando a este proceso de curación se le añade un andamio donde existen propiedades que favorecen la regeneración ósea, esta plantilla de hueso primario se ve adelantada a una etapa de mineralización de matriz ósea, por lo que, los condrocitos hipertróficos e hiperplásicos que se visualizaban en el grupo control se visualizarán en menor cantidad en el grupo experimental. Esto se puede atribuir a la propiedad que presenta la hidroxiapatita de ser un material osteoinductor donde permite la formación de un primer callo o callo blando que es guiada por los condrocitos (**Figura 15**).



**Figura 15.** Esquema propuesto del posible mecanismo de la actividad celular en la membrana compuesta de HA, PVA y PLA. Los componentes de la membrana favorecen el proceso de regeneración ósea al presentar características de andamio. El PLA tiene la propiedad de ser un material hidrofóbico y sus fibras de tamaño submicrométrico brindan una estructura de soporte y estructura para el PVA. Asimismo, el PVA tiene la propiedad de ser biodegradable, no causa toxicidad y es hidrofílico (38). La HA por su parte cumple la función de ser un material osteoinductor lo que favorece la formación de hueso nuevo (34). En la técnica de elaboración de la membrana la HA es embebida en el PVA con la función de ser liberada cuando se presente en contacto con fluidos fisiológicos. Así tenemos que el ácido poliláctico funciona como el armazón el cual es relleno con HA y PVA simulando la matriz extracelular donde posteriormente por medio de serán reclutadas las células madre mesenquimales (CMS), proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) son pieza clave para la formación de condensaciones mesenquimatosas condrogénicas (60).

Los componentes de la membrana favorecen el proceso de regeneración ósea al presentar características de andamio. El PLA tiene la propiedad de ser un material hidrofóbico y sus fibras de tamaño submicrométrico brindan una estructura de soporte y estructura para el PVA. Asimismo, el PVA tiene la propiedad de ser biodegradable, no causa toxicidad y es hidrofílico (37). La HA por su parte cumple la función de ser un material osteoinductor lo que favorece la formación de hueso nuevo (34). En la técnica de elaboración de la membrana la HA es embebida en el PVA con la función de ser liberada cuando se presente en contacto con fluidos fisiológicos. Así tenemos que el ácido poliláctico funciona como el armazón el cual es relleno con HA y PVA simulando la matriz extracelular.

Este estudio piloto es parte de la mejora para futuros estudios a mayor escala y brinda pauta para continuar con el estudio específico del uso de la membrana como andamio para lograr una consolidación ósea exitosa.

## CONCLUSIONES

- Se determina un efecto de formación de hueso trabecular en mayor cantidad en el grupo con tratamiento que en el grupo control.
- El modelo de fractura estandarizado con pérdida de tejido en fémur es un modelo reproducible.
- La membrana compuesta de HA, PVA y PLA tiene una propiedad osteoinductiva y osteoconductiva a los 30 días en un modelo de fractura de rata Wistar con pérdida de tejido.

- El diseño del experimento piloto es viable para futuros estudios a mayor escala

## **CAPITULO III**

### **SESGOS Y LIMITACIONES**

Dentro de los sesgos que presenta este estudio es la movilidad que presenta el clavo de Kirschner dentro del canal medular a los 30 días, la tonalidad de imágenes de rayos X y el posible esparcimiento de la membrana posterior a su colocación en el sitio de fractura.

### **FORTALEZAS**

Lograr una metodología estandarizada para evaluación de biomateriales.

Observación de osificación endocondral

### **PERSPECTIVAS**

Utilizar una malla de titanio en el sitio de pérdida de tejido y excluir el alambre de cerclaje.

Añadir al experimento un grupo de tratamiento con injerto óseo comercial para conocer resultados con tratamientos validados.

Recurrir a análisis macroscópicos e histológicos de diferentes periodos de tiempo para conocer los cambios que ocurren en el tejido óseo y reconocer una consolidación ósea a los 30, 45 y 60 días.

Estudios de fluorescencia para observar adhesión celular de condrocitos y osteoblastos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Liu Y, Lim J, Teoh SH. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2013;31(5):688–705. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.003>
2. Arroyo L, Morales M, Morán C, Zaca P, Vazquez de Lara L, Tlatelpa B, et al. Development of a polylactic acid, polyvinyl alcohol, and hydroxyapatite composite membrane as a scaffold for bone regeneration. In vivo effect on a murine model of trabecular bone fracture. B.L. Arroyo-Reyes. 2021;
3. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
4. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*. 2010;285(33):25103–8.
5. Riancho JA. Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto. 2011;7:2–5.
6. Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, Teti A. Reprint of: The Great Beauty of the osteoclast. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2014;561:13–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.08.009>
7. Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res*. 2013;92(10):860–7.
8. Ross MH, Pawlina W. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2007.
9. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis P V. Bone regeneration: Current concepts and future directions. *BMC Med* [Internet]. 2011;9(1):66. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/9/66>
10. Matsuo K, Irie N. Osteoclast – osteoblast communication. 2008;473:201–9.

11. Marsell R, Einhorn TA. THE BIOLOGY OF FRACTURE HEALING. 2011;
12. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, et al. Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res.* 2019;37(1):35–50.
13. Fisher JS, Kazam JJ, Fufa D, Bartolotta RJ. Radiologic evaluation of fracture healing. *Skeletal Radiol.* 2019;48(3):349–61.
14. Gómez-Barrena E, Padilla-Eguiluz NG, García-Rey E, Hernández-Esteban P, Cordero-Ampuero J, Rubio-Suárez JC. Validation of a long bone fracture non-union healing score after treatment with mesenchymal stromal cells combined to biomaterials. *Injury.* 2020;51:S55–62.
15. Altamirano MA. Traumatología y ortopedia. In: CAM Curso de actualización médica [Internet]. Mc Graw-Hill; 2008. p. 1–5. Available from: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2404&sectionid=187821419>
16. Malone TR, Hazle C, Grey ML, Hendrix PC. Fracturas de huesos largos | Imagenología para el profesional en ciencias de la salud | AccessMedicina | McGraw Hill Medical [Internet]. Eds. 2018 [cited 2022 Nov 10]. Available from: <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?sectionid=187821419&bookid=2404&Resultclick=2>
17. Fernandes MR, Pedroso AR. Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods experiMentaÇÃo aniMal: uM olhar soBre Ética, BeM-estar e MÉtodos alternativos. *Rev Assoc Med Bras* [Internet]. 2017;63(11):923–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.63.11.923introduction>
18. Pons JMV, Permanyer-Miralda G, Camí J, Rodés J. La experimentación animal y el progreso de la medicina. *Med Clin (Barc).* 2014;143(10):448–54.
19. Yuehui A, Richard J F, Tom P, Robert A D. Production of a standard closed fracture in the rat tibia. *J Orthop Trauma* [Internet]. 1994 [cited 2021 Sep 28];8(2):111–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8207566/>

20. Gröngröft I, Wissing S, Meesters DM, Poeze M, Matthys-Mark R, Ito K, et al. Development of a novel murine delayed secondary fracture healing in vivo model using periosteal cauterization. *Arch Orthop Trauma Surg* [Internet]. 2019;139(12):1743–53. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00402-019-03255-y>
21. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold design for bone regeneration. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2014;14(1):15–56.
22. Tsai CH, Hung CH, Kuo CN, Chen CY, Peng YN, Shie MY. Improved bioactivity of 3D printed porous titanium alloy scaffold with chitosan/magnesium-calcium silicate composite for orthopaedic applications. *Materials (Basel)*. 2019;12(2):12–3.
23. Estrada C, Paz C, López E. INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO : CONSIDERACIONES BÁSICAS. *Rev EIA* [Internet]. 2006 [cited 2020 Nov 26];(5):93–100. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-12372006000100008&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372006000100008&lng=en&tlng=es).
24. Diomedede F, D'Aurora M, Gugliandolo A, Merciaro I, Orsini T, Gatta V, et al. Biofunctionalized scaffold in bone tissue repair. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):1–17.
25. Yan Y, Chen H, Zhang H, Guo C, Yang K, Chen K, et al. Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration. *Biomaterials* [Internet]. 2019;190–191(August 2018):97–110. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.033>
26. Hong J, Yeo M, Yang GH, Kim G. Cell-Electrospinning and Its Application for Tissue Engineering. 2019;
27. Haider A, Haider S, Kang IK. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arab J Chem* [Internet]. 2018;11(8):1165–

88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015>
28. Qasim SB, Zafar MS, Najeeb S, Khurshid Z, Shah AH, Husain S, et al. Electrospinning of chitosan-based solutions for tissue engineering and regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
29. Liu Z, Ramakrishna S, Liu X. Electrospinning and emerging healthcare and medicine possibilities. *APL Bioeng.* 2020;4(3).
30. Asmatulu R. Highly Hydrophilic Electrospun Polyacrylonitrile/Polyvinylpyrrolidone Nanofibers Incorporated with Gentamicin as Filter Medium for Dam Water and Wastewater Treatment. *J Membr Sep Technol.* 2016;5(2):38–56.
31. Pelipenko J, Kocbek P, Govedarica B, Rošic R, Baumgartner S, Kristl J. The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. *Eur J Pharm Biopharm [Internet].* 2013;84(2):401–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.09.009>
32. Sheikh Z, Najeeb S, Khurshid Z, Verma V, Rashid H, Glogauer M. Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. *Materials (Basel).* 2015;8(9):5744–94.
33. Rodríguez-alba E, Dubón AEB, López HEG, Godoy CAK, Salguero JB, Hernández EMT, et al. La Ciencia de los Polímeros Biodegradables. 2017;1–15.
34. Baino F, Novajra G, Vitale-brovarone C. Bioceramics and Scaffolds : A winning Combination for Tissue engineering. 2015;3(December):1–17.
35. Saucedo Acuña RA, García MG, Ríos Arana JV, López Reyes SY. Corrección de defectos óseos en el área de Ingeniería tisular Correction of bone defects by tissue Engineering. *Acta Univ.* 2012;22:26–32.
36. Wissing TB, Bonito V, van Haften EE, Doeselaar M van, Brugmans MM, Janssen HM, et al. Macrophage-driven biomaterial degradation depends on scaffold microarchitecture. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7(APR).

37. Gaaz TS, Sulong AB, Akhtar MN, Kadhum AAH, Mohamad AB, Al-amieriy AA. Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol , Halloysite Nanotubes and Their Nanocomposites. 2015;22833–47.
38. Fahmy A, Kamoun EA, El-Eisawy R, El-Fakharany EM, Taha TH, El-Damhougy BK, et al. Poly(vinyl alcohol)-hyaluronic acid membranes for wound dressing applications: Synthesis and in vitro bio-evaluations. *J Braz Chem Soc.* 2015;26(7):1466–74.
39. Pelipenko J, Kocbek P, Govedarica B, Rošic R, Baumgartner S, Kristl J. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. *Eur J Pharm Biopharm [Internet].* 2013;84(2):401–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.09.009>
40. Serna C. L, Rodríguez de S. A, Albán A. F. Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones. *Ing y Compet.* 2011;5(1):16.
41. Li G, Zhao M, Xu F, Yang B, Li X, Meng X, et al. Synthesis and Biological Application of. 2020;
42. García-Garduño M, Reyes-Gasga J. LA HIDROXIAPATITA, SU IMPORTANCIA EN LOS TEJIDOS MINERALIZADOS Y SU APLICACIÓN BIOMÉDICA. 2006;90–5.
43. Gregor A, Filová E, Novák M, Kronek J, Chlup H, Buzgo M, et al. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *J Biol Eng.* 2017;11(1):1–21.
44. Almazán A, García JC, Lira JM, Arrelín G, Chimal J, Díaz de León L, et al. Investigación experimental de la regeneración ósea en fémures de rata después de la aplicación de colágena 1 polimerizada: Estudio radiológico, histológico e histoquímico. *Revista Mexicana de Ortopedia y Traumatología [Internet].* 1996 [cited 2020 Nov 27];142–52. Available from: [https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=1UgwQ5q2yvMC&oi=fnd&pg=PA142&dq=estudio+histologico+callo+óseo&ots=uarwKuz1d0&sig=F\\_gi](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=1UgwQ5q2yvMC&oi=fnd&pg=PA142&dq=estudio+histologico+callo+óseo&ots=uarwKuz1d0&sig=F_gi)

MOy9CciG1iaQhFr7wK9i2lg&redir\_esc=y#v=onepage&q=estudio histologico callo óseo&f=false

45. Budiatin AS, Gani MA, Samirah, Ardianto C, Raharjanti AM, Septiani I, et al. Bovine Hydroxyapatite-Based Bone Scaffold with Gentamicin Accelerates Vascularization and Remodeling of Bone Defect. *Int J Biomater*. 2021;2021.
46. Minto BW, Sprada AG, Neto JAG, de Alcântara BM, Rocha TAS de S, Hespanha ACV, et al. Three-dimensional printed poly (L-lactide) and hydroxyapatite composite for reconstruction of critical bone defect in rabbits. *Acta Cir Bras*. 2021;36(4).
47. Weng W, Song S, Cao L, Chen X, Cai Y, Li H, et al. A Comparative Study of Bioartificial Bone Tissue Poly-L-lactic Acid / Polycaprolactone and PLLA Scaffolds Applied in Bone Regeneration. 2014;2014.
48. Ji C, Bi L, Li J, Fan J. Salvianolic acid b-loaded chitosan/hydroxyapatite scaffolds promotes the repair of segmental bone defect by angiogenesis and osteogenesis. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:8271–84.
49. Hassanajili S, Karami-Pour A, Oryan A, Talaei-Khozani T. Preparation and characterization of PLA/PCL/HA composite scaffolds using indirect 3D printing for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C [Internet]*. 2019;104(June):109960. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109960>
50. Wang Z, Hui A, Zhao H, Ye X, Zhang C, Wang A, et al. A novel 3D-bioprinted porous nano attapulгите scaffolds with good performance for bone regeneration. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:6945–60.
51. Dinescu S, Ionita M, Ignat SR, Costache M, Hermenean A. Graphene oxide enhances chitosan-based 3D scaffold properties for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20).
52. Kuzyk PRT, Schemitsch EH, Davies JE. A biodegradable Scaffold for the treatment of a diaphyseal bone defect of the tibia. *J Orthop Res*. 2010;28(4):474–80.

53. Han N, Zhang PX, Wang W Bin, Han DC, Chen JH, Zhan HB, et al. A new experimental model to study healing process of metaphyseal fracture. *Chin Med J (Engl)*. 2012;125(4):676–9.
54. Ye P, Yu B, Deng J, She RF, Huang WL. Application of silk fibroin/chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffold in the repair of rabbit radial bone defect. *Exp Ther Med*. 2017;14(6):5547–53.
55. Gobierno de México [Internet]. [cited 2022 Feb 15]. Available from: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999\\_220801.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf)
56. Díez García M del P, Chávez Arias D, Mercado Camargo R, Dominguez Hernández VM, Torres MA, Lomelí Mejía PA, et al. Modelo experimental de fracturas y consolidación ósea en ratas. *Rev Mex Ortop y Traumatol*. 2002;16(3):113–7.
57. Roberto-Rodrigues M, Fernandes RMP, Senos R, Scoralick ACD, Bastos AL, Santos TMP, et al. Novel rat model of nonunion fracture with vascular deficit. *Injury*. 2015;46(4):649–54.
58. Basurto RN, Arrieta LS, Villegas Castrejón H. Estudio de la consolidación ósea en rata por microscopía electrónica de barrido ambiental. *Vet Mex*. 2008;39(2):187–98.
59. Knuth C, Kiernan C, Wolvius E, Narcisi R, Farrell E. Understanding tissue-engineered endochondral ossification; towards improved bone formation. *Eur Cells Mater*. 2019;37:277–91.
60. Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(1):1–20.

## ANEXOS

## 1. REGISTRO DE PROTOCOLO



Oficio No. SIEP/C.I./123/2022

ASUNTO: CONSTANCIA DE REGISTRO

D.C. LUIS GUILLERMO VÁZQUEZ DE LARA CISNEROS  
DR. MARCO ANTONIO MORALES  
DIANELLY LÓPEZ TORRES

PRESENTE.

El Comité de Investigación y de Ético de la Facultad de Medicina de la B.U.A.P., a través de la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado hace **CONSTAR** que el Proyecto de Investigación presentado en autoría Colectiva ha cambiado su título:

- > DIANELLY LÓPEZ TORRES
- > D.C. LUIS GUILLERMO VÁZQUEZ DE LARA CISNEROS
- > DR. MARCO ANTONIO MORALES

Título anterior:

"EFECTO DE UNA MEMBRANA COMPUESTA DE HIDROXIAPATITA CON ALCOHOL POLIVINÍLICO Y ÁCIDO POLILÁCTICO SOBRE LA REGENERACIÓN ÓSEA EN FRACTURAS CON PÉRDIDA DE TEJIDO"

Título actual:

"EFECTO DE UNA MEMBRANA COMPUESTA DE HIDROXIAPATITA CON ALCOHOL POLIVINÍLICO Y ÁCIDO POLILÁCTICO SOBRE LA REGENERACIÓN ÓSEA EN FRACTURAS CON PÉRDIDA DE TEJIDO EN LA RATA (RATTUS NORVEGICUS) DE LA CEPA WISTAR: ESTUDIO PILOTO"

Ha sido registrado en esta Secretaría con los siguientes datos:

Fecha de Registro: 18 de abril de 2022

Número de Libro: 2

Número de Hoja: 149

Número de Registro: 879

Vigencia: Inicio: 18 de abril de 2022 Término: 31 de diciembre de 2022

ATENTAMENTE

"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"

H. PUEBLA DE 7, A 18 DE ABRIL DE 2022

*Lis Rosales Baez*

D. EP. LIS ROSALES BAEZ  
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y  
ESTUDIOS DE POSGRADO - FMBUAP



Cep. D.C. MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ MONTAÑO – Coordinadora del Comité de Investigación de la S.I.E.P. - FMBUAP  
Cep. D.C. /MMA DEL CARMEN ZAMORA GINÉS – Coordinadora de la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación, FMBUAP  
Cep. Muestre  
DED LRO/veers.

Facultad de Medicina | 18 Sur 2701, Col. Volcanes,  
Puebla, Pue. C.P. 72410  
222 226 55 90  
Ext. 8047 y 8048

## 2. REGISTRO DE PROTOCOLO VIEP



Oficio VIEP/0424/2022

**D. C. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros.**  
DIRECTOR  
Facultad de Medicina de la  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla  
PRESENTE

Por este medio hago constar que después de haber verificado que usted es miembro del Padrón de Investigadores de esta Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado y que su protocolo ha sido evaluado por el Comité para el cuidado y uso de animales de laboratorio, por lo cual se le autoriza la solicitud del requerimiento de acuerdo al cronograma adjunto, los cuales serán utilizados para la realización de los experimentos que se regularan para llevar a cabo el protocolo de investigación con clave: **100409288-UALWEP-22/1 TITULADO "EFECTO DE UNA MEMBRANA COMPUESTA DE HIDROXIAPATITA CON ALCOHOL POLIVINÍLICO Y ÁCIDO POLILÁCTICO SOBRE LA REGENERACIÓN ÓSEA EN FRACTURAS CON PÉRDIDA DE TEJIDO: ESTUDIO PILOTO."** el cuál tiene como equipo de trabajo:

- **Investigadores Responsable:**  
**Dr. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros, 100409288, Facultad de Medicina**  
**Dr. Marco Antonio Morales Sánchez 100443211, Ingeniería Química**
- **Alumno(s) Responsable(s) del Proyecto:**  
**Dianelly López Torres, Maestría en Ciencias Médicas e Investigación de la Facultad de Medicina,**  
**220450029**

Asimismo, se hace constar que los animales objeto de este estudio serán criados y mantenidos en las instalaciones del Bioterio "Claude Bernard", de acuerdo a los lineamientos establecidos en la "Guía para el cuidado y uso de Animales de Laboratorio" y las especificaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1995, y la Legislación Mexicana relativa vigente y debe ser aprobado por el Comité para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CXUAL) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, el cual le otorgará una clave que deberá de usar.

También se hace constar que se aplicarán todos los esfuerzos encaminados a minimizar el sufrimiento y la cantidad de animales a utilizar en el proyecto, así como los criterios de manejo, anestesia, analgesia y eutanasia vigentes y que el protocolo ha sido avalado por el Comité para la Investigación y Cuidado de los Animales de Laboratorio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Se extiende la presente para los efectos correspondientes.

Atentamente  
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"  
H. Puebla de Z., a 22 de marzo de 2022

  
Dra. Rosario Hernández Huesca  
Directora General de Investigación

C.c.p. MVZ. Francisco Ramos Collazo, Bioterio "Claude Bernard".  
Dra. "Kiki" 316"

Vicerrectoría de Investigación y  
Estudios de Posgrado

Torre de Gestión Académica y  
Servicios Administrativos, piso 6.  
Avenida Central, Ciudad Universitaria,  
Puebla, Pue. C.P. 72570

### 3. BIOÉTICA

El manejo, mantenimiento y sacrificio de los animales se realizará en apego a la NOM-062- ZOO-1999 sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. El objetivo la norma ya mencionada es establecer y unificar las especificaciones técnicas para el cuidado, producción y uso de los animales de laboratorio que debe cumplir el personal relacionado en el campo de investigación con este tipo de animales. Debe aplicarse a todos los Bioterios o establecimientos en el territorio mexicano que manejen roedores: ratón, ratas, cobayos y hámster. El Bioterio “Claude Bernard” de la BUAP cumple con los lineamientos establecidos en la norma que refieren al personal, los cuidados y las instalaciones adecuadas para mantener al modelo biológico. Los responsables internos al cumplimiento de la norma son el médico veterinario, un investigador de alta jerarquía de la institución propia que tenga experiencia en el cuidado y manejo de animales de laboratorio y el alumno de maestría. La identificación de los animales se llevará a cabo por medio de una ficha técnica en la cual se describa el estado genético y si contiene o no alguna enfermedad, la edad, peso y género. Se seguirán todos los lineamientos que mencionen proteger a los animales contra condiciones climáticas extremas, se les brindará agua y alimento cuando este indicado y se protegerán contra traumatismos.

#### *CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD*

Se deberán contemplar las medidas mencionadas en el punto número 10 de la norma NOM-062- ZOO-1999 donde se menciona la importancia de las medidas específicas de cada institución de investigación, capacitación del personal expuesto, instalaciones y equipamiento entre otros.

#### **4. LOGÍSTICA**

##### *RECURSOS HUMANOS*

Director de tesis

D.C. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros

Codirector de tesis

Dr. Marco Antonio Morales Sánchez

Asesor de prácticas de laboratorio. Médico Cirujano Plástico

Dr. Raúl Ricaño Rueda

Patología clínica

Dra. Nora Fernández Tamayo

Asesora de prácticas de laboratorio

M.C. Beatriz Tlatelpa Romero

Médico veterinario y zootécnico del Bioterio Central “Claude Bernard” BUAP

Dr. Francisco Ramos Collazo

Médico Radiólogo

Dr. Mauricio Olivera Velázquez

Alumna de la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación

Dianelly López Torres

##### *RECURSOS MATERIALES*

Equipo reactivos y consumibles del laboratorio de Medicina Experimental de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

##### *RECURSOS FINANCIEROS*

Todos los experimentos se realizarán y financiarán por el laboratorio de Medicina Experimental de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

## 5. VARIABLES DE MEDICIÓN

### VARIABLES DE MEDICIÓN

VARIABLE Dependiente	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA	MEDICION	VALOR
Condrocitos	Células que conforman el tejido cartilaginoso	Células que ocupan un lugar llamado <i>laguna</i> . Mostrándose hipertróficos e hiperplásicos	Cuantitativa	Medición con software Orbit Image del área teñida por Tricrómico de Masson.	cantidad de área teñida

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA	MEDICION	VALOR
Tratamiento (membrana compuesta de hidroxiapatita con alcohol polivinílico y ácido poliláctico).	Andamio compuesto de un material cerámico (Hidroxiapatita) y dos materiales polímeros sintéticos (ácido poliláctico y alcohol polivinílico)	Andamio caracterizado como membrana colocada en el espacio de fractura con pérdida de tejido.	Nominal	Cualitativa	Presente/ausente

## 6. CONSTANCIA CURSO DE MANEJO DE ANIMALES



**BUAP**

### MEMORÁNDUM

Puebla, Pue., 24 de marzo de 2022.

**PARA: DR. LUIS GUILLERMO VAZQUEZ DE LARA  
BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**DE: M.V.Z. FRANCISCO RAMOS COLLAZO.  
DIRECTOR DEL BIOTERIO "CLAUDE BERNARD"**

*Informo a Usted que el C. DIANELLY LÓPEZ TORRES, aprobó el curso de manejo y vías de administración en rata.*

*Sin más por el momento, quedo a sus órdenes.*

**ATENTAMENTE  
"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"**

**Mtro. FRANCISCO RAMOS COLLAZO.  
DIRECTOR DEL BIOTERIO "CLAUDE BERNARD"**

c.c.p.- archivo




Bioterio "Claude Bernard"


14 Sur y Av. San Claudio, edif. 1BCB1,  
Ciudad Universitaria, Puebla, Pue.  
01 (222) 229 55 00 Ext. 2380 y 2381

## 7. INFORMACIÓN DE BIOMODELOS




**Tabla 3.** Datos del procedimiento quirúrgico de estandarización de fractura I

#	Fecha de cirugía	Código	Sexo	Peso	Objetivo
	3 / abril / 2022	R2E_DLT	Macho	250 g	Estandarizar modelo de fractura con pérdida de tejido en fémur izquierdo de rata (cepa Wistar)
	3 / abril / 2022	R3E_DLT	Macho	245 g	




**Tabla 4.** Datos del procedimiento quirúrgico de estandarización de fractura II

#	Fecha de cirugía	Código	Sexo	Peso	Objetivo
	10/ abril / 2022	R4E_DLT	Macho	260 g	Estandarización de fractura con pérdida de tejido en fémur izquierdo de rata (cepa Wistar)
	10/ abril / 2022	R5E_DLT	Macho	260 g	Estandarización de fractura con pérdida de tejido en fémur izquierdo de rata (cepa Wistar)

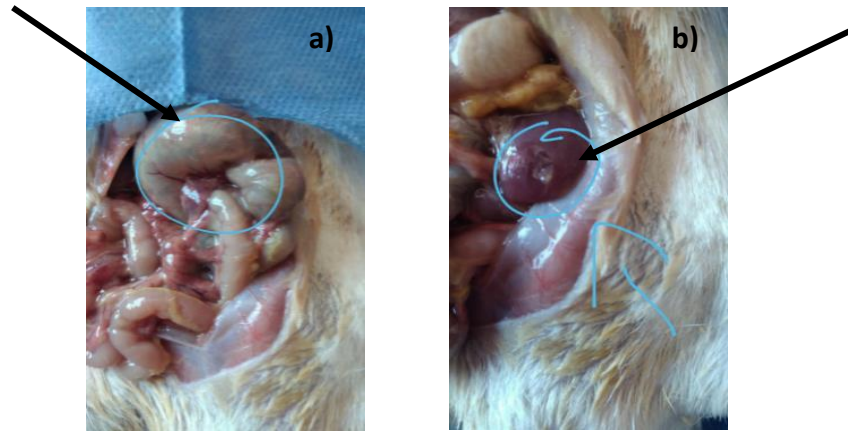
**Tabla 5.** Datos del procedimiento quirúrgico del grupo control.

	Fecha de cirugía	Código	Sexo	Peso	Objetivo
	7/ mayo / 2022	R7E_DLT C1	Macho	270 g	Reproducir la técnica de modelo de fractura <i>in vivo</i> .
	29/ mayo / 2022	R8E_DLT C2	Macho	295 g	
	15/ junio / 2022	R11E_DLT C3	Macho	260 g	

**Tabla 6.** Datos del procedimiento quirúrgico del grupo experimental.

#	Fecha de cirugía	Código	Sexo	Peso	Objetivo
	4/ junio / 2022	R9E_DLT M1	Macho	295 g	Adaptar una membrana compuesta de hidroxapatita, alcohol polivinílico y ácido poliláctico en el defecto óseo de fractura generado.
	4/ junio / 2022	R10E_DLT M2	Macho	300 g	
	15/ junio / 2022	R12E_DLT M3	Macho	275 g	

## 8. IMÁGENES DE NECROPSIA EN RATA WISTAR



**Figura 7.** Imágenes de necropsia en rata Wistar. a) Imagen donde se muestra obstrucción intestinal. b) Imagen que representa ulceración hepática.



**BUAP**

**“HUP, 50 años de enseñanza y salud”**

**Oficio No. SIEP/MCMI/307/2022**

**ASUNTO: ACEPTACIÓN E IMPRESIÓN DE TESIS**

**C. LÓPEZ TORRES DIANELLY**  
**220450029**  
**PRESENTE.**

La que suscribe D.C. Irma Zamora Ginez Coordinadora de la Maestría en Ciencias Médicas e Investigación, me permito informarle que, he recibido la tesis titulada **“Efecto de una membrana compuesta de hidroxapatita con alcohol polivinílico y ácido poliláctico sobre la regeneración ósea en fracturas con pérdida de tejidos en la rata (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar: estudio piloto”** y, las cartas de aceptación de impresión del Comité Revisor, así como la calificación anti plagio menor a 40%, por lo que puede proceder a la impresión de su tesis y continuar con los trámites administrativos para presentar el examen de grado.

Sin más por el momento, le reitero la seguridad de mis consideraciones más distinguidas.

**A T E N T A M E N T E**  
**“PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR”**  
**H. PUEBLA DE Z., A 22 DE NOVIEMBRE DE 2022**

**D. C. IRMA DEL CARMEN ZAMORA GINEZ**  
**COORDINADORA DE LA MAESTRÍA EN**  
**CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN**



C.c.p. Archivo  
DC ICZG/\*mmrn.