



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS
NANOFIBRILARES DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO/CLORHEXIDINA”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA CON OPCIÓN TERMINAL EN
REHABILITACIÓN ORAL**

PRESENTA:

BRYAN IVAN MARTÍN DEL CAMPO TÉLLEZ

ID. 218450016

DIRECTOR DE TESIS
MRO. KARLA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ
ID. 100524781

DIRECTOR DISCIPLINARIO
MRO. NORMA ELI GUZMÁN JUÁREZ
ID. 100525992

DIRECTOR METODOLÓGICO
DR. ALBERTO VINICIO JEREZANO DOMÍNGUEZ
ID. NSS524063

ASESOR EXTERNO
DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

LECTOR DE TESIS
BRENDA ERÉNDIDA CASTILLO SILVA
NSS526469

Mayo del 2020



BUAP

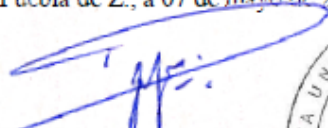
Oficio No. FESIEP/099/2020

C. Bryan Iván Martín Del Campo Téllez
Matrícula: 218450016
Alumno de la Maestría en Estomatología
Con opción Terminal en Rehabilitación Oral
De la Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
P R E S E N T E.

El que suscribe, MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez, Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por este medio me permito informar a usted que esta Secretaría aprueba la impresión de la Tesis titulada "Síntesis y caracterización de andamios nanofibrilares de ácido poli-láctico/clorhexidina", misma que presentará para realizar su examen profesional y obtener el grado de Maestro en Estomatología con Opción Terminal en Rehabilitación Oral.

Sin más por el momento, deseándole lo mejor, le reitero mi distinguida consideración.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 07 de mayo de 2020.


MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



Facultad
de Estomatología

31 Poniente 1304, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C. P. 72410
01 (222) 229 55 00 Ext. 6400

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS RECEPCIONAL

Para obtener el Grado de: **Maestro en Estomatología con opción terminal en Rehabilitación Oral.**
Registro CIFE: 2019113. Fecha: 07 de mayo de 2020

Título de la Tesis (anexarlo impreso y CD) "SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS NANOFIBRILARES DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO/CLORHEXIDINA"

Nombre del alumno: Bryan Ivan Martín del Campo Téllez Matrícula: 218450016

Domicilio: Av. Mariano Escobedo #126, Fracc. Jardines de la Cruz, C.P. 20250, Aguascalientes, Ags.

Tel: 4493869495

Fecha de ingreso a la Facultad: Enero 2018

Firma: 

Director de tesis: Karla Rodríguez Hernández Grado académico: **Maestra en Rehabilitación Oral**
Adscripción: **Facultad de Estomatología** _ID: 100524781 TEL: _2224268122

Firma: 

Director disciplinario: Norma Eli Guzmán Juárez Grado académico: **Maestra en Rehabilitación Oral**
Adscripción: **Facultad de Estomatología** ID: 100525992 Tel: 2291611142

Firma: 

Director metodológico: Alberto Vinicio Jerezano Domínguez Grado académico: **Doctor en Ciencias Estomatológicas**
Adscripción: **Facultad de Estomatología** ID: NSS52463 Tel: 2224269508

Firma: 

Asesor Externo: Marco Antonio Álvarez Pérez Grado académico: **Doctor en Ciencias**
Adscripción: **Facultad de Odontología UNAM** Tel: 5579202482

Firma: 

Lector: Brenda Eréndida Castillo Silva Grado académico: **Doctora en Ciencias**
Adscripción: **Facultad de Estomatología** ID: NSS526469 Tel: 4442426077

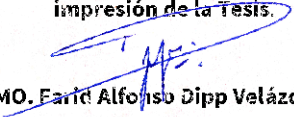
Firma: 

Nombre y firma de aprobación del presidente de la academia/Responsable de la Maestría en Estomatología con Opción terminal en Rehabilitación Oral

M. E. I. Guillermo Franco Romero

Firma: 

La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología, autoriza la impresión de la Tesis.


MO. Eric Alfonso Dipp Velázquez

Fecha: 07 de mayo de 2020

Sello



AGRADECIMIENTOS

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por permitir el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Karla Hernández por compartir su conocimiento y tiempo para poder concluir el proyecto y durante todo el trayecto como estudiante de la maestría dentro y fuera de clínica.

Al Dr. Jerezano por compartir su tiempo y conocimiento durante el proyecto y por abrirme las puertas del laboratorio multidisciplinario de la FEBUAP.

A la Dra. Norma Eli por compartir su conocimiento y tiempo para poder concluir la tesis, también por su excelente trabajo y apoyo dentro de la clínica de Rehabilitación.

Al Dr. Willy por ser un gran coordinador guiándonos durante todo el trayecto de la maestría, por todas sus enseñanzas y amistad.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez por abrirme las puertas del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la UNAM por brindarme su amistad y por todo el gran apoyo recibido durante mis estancias.

Al Dr. David Masuoka por brindarme su amistad y confianza desde que nos conocemos. Y por el gran ejemplo que me ha dado todo este tiempo.

Al Dr. Daniel Chavarría por recibirme en la Universidad de Costa Rica y en el LANOTEC e introducirme en el aprendizaje del conocimiento de la caracterización de biomateriales.

A Osmar por guiarme durante las pruebas en el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la UNAM.

A Vicente Esparza por compartir su tiempo, conocimiento y amistad.

Al CUVYyTT en especial al Dr. Eric Reyes por permitirme trabajar en el laboratorio.

Agradezco el apoyo por parte de CONACyT por la beca otorgada con número de becario: 892291, para realizar mis estudios de maestría.

Agradezco el apoyo por parte de DGAPA-UNAM: proyecto IT203618 que ha permitido la realización de esta investigación.

Agradezco el apoyo por parte del CONACyT del proyecto A1-S-9178 del programa del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, que ha permitido la realización de esta investigación.

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	9
2.	ANTECEDENTES GENERALES.....	11
2.1	Estructura del tejido periodontal.....	11
2.2	Enfermedad periodontal	11
2.3	Defectos óseos periodontales.....	12
2.4	Estructura de la matriz extracelular nativa	13
2.5	Biocompatibilidad	14
2.6	Ingeniería de Tejidos	15
2.7	Requisitos para un exitoso desarrollo en ingeniería de tejido	16
2.8	Antisépticos locales.....	16
2.9	Clorhexidina (CHX)	17
2.10	Ácido Poli-láctico (PLA).....	19
2.11	Sistemas de liberación sostenida	20
2.12	Técnica de hilado por propulsión de gas (AJS).....	21
2.13	Técnica de caracterización del material.....	21
2.13.1	Espectrometría infrarroja transformada con Fourier (FTIR).....	21
2.13.2	Microscopia electrónica de barrido (MEB) y espectrómetro de dispersión de energía de rayos X (EDS).....	22
3.	ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	24
4.	PLANTEAMIENTO Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	27
5.	JUSTIFICACIÓN.....	28
6.	HIPÓTESIS	29
7.	OBJETIVOS.....	29
7.1	Objetivo general	29
7.2	Objetivos particulares o específicos	29
8.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
8.1	Diseño del estudio	30
8.2	Población y muestreo.....	30
8.3	Criterios de selección.....	30
8.4	Concordancia y fiabilidad.....	31
8.5	Ubicación espacio temporal.....	32
8.6	Diseño de los andamios.....	32
8.7	Caracterización de los andamios	32
8.8	Cultivo celular	32

8.9	Ensayo de adhesión celular.....	33
8.10	Ensayo de proliferación celular	33
8.11	Esquema de trabajo.....	34
8.12	Análisis Estadístico.....	34
8.13	Logística	35
8.13.1	Recursos Humanos	35
8.13.2	Recursos Materiales.....	35
8.13.3	Recursos Financieros.....	35
8.14	Bioética.....	36
9.	RESULTADOS	37
9.1	CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL	37
9.1.1	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	37
9.1.2	Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS).....	40
9.1.3	Espectroscopía Infrarroja.....	43
9.2	ENSAYOS BIOLÓGICOS.....	45
9.2.1	Ensayo de adhesión celular.....	45
9.2.2	Ensayo de proliferación celular	46
10.	DISCUSION	47
11.	CONCLUSIONES.....	50
12.	BIBLIOGRAFÍA	51

RESUMEN

La bioingeniería de tejidos busca las estrategias necesarias para restaurar, mantener o regenerar la función de tejidos enfermos o dañados del cuerpo humano. A través de varios materiales biofuncionales, entre ellos los poliméricos, actuando como una matriz de soporte para la proliferación, adhesión y diferenciación celular. El ácido poli-láctico (PLA) es uno de los biopolímeros más prometedores para aplicaciones biomédicas, debido a sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, mecánicas y aprobación por la FDA (Food and Drug Administration).

La clorhexidina (CHX) es un antiséptico altamente utilizado en odontología por su eficacia clínica y buen registro de seguridad, mayormente utilizado para prevenir la placa dental por más de 50 años.

En este estudio hemos producido nanofibras obtenidas mediante la técnica de hilado por propulsión de gas AJS (Air Jet Spinning) a partir de una mezcla de PLA y CHX. Tratando de fabricar membranas nanofibrilares con propiedades y características que ofrecen los andamios biodegradables de PLA, agregándole una actividad antibacteriana y de esta manera contrarrestar potenciales infecciones postquirúrgicas presentes como uno de los principales fracasos de los tratamientos dentro de la regeneración tisular en la clínica.

Se llevo a cabo la síntesis de andamios de PLA/CHX A diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.4 y 1%). Los andamios nanofibrilares obtenidos fueron caracterizados morfológicamente por microscopía electrónica de barrido (MEB); la incorporación del fármaco en las nanofibras se determinó por espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) y la espectrometría infrarroja transformada con fourier (FTIR). También se evaluó la biocompatibilidad de los andamios mediante células osteoblásticas (hFBO).

Los resultados obtenidos demuestran que las nanofibras fueron cargadas correctamente con distintas concentraciones de CHX, respetando la morfología y distribución fibrilar. En las pruebas de biocompatibilidad, los andamios de PLA/ CHX disminuyeron la adhesión y proliferación en comparación a los andamios de PLA hasta los 12 días. Se sugiere que estudios subsecuentes evalúen la citotoxicidad a nivel tisular, la proliferación celular a mayor tiempo y analizar la cinética de liberación de la CHX.

PALABRAS CLAVE

Andamio, ácido poli-láctico, clorhexidina, nanofibras, hilado por propulsión de gas

1. INTRODUCCIÓN

La bioingeniería de tejidos está orientada al desarrollo de materiales capaces de facilitar la regeneración de un tejido dañado por un trauma o enfermedad. Para lograr lo anterior; la bioingeniería de tejidos se enfoca a imitar a la matriz extracelular de los tejidos, por medio de andamios poliméricos biocompatibles, que pueden ser implantados directamente en el sitio deseado y colonizados por células blanco.

El PLA tiene características que lo hacen un candidato atractivo para la síntesis y diseño de andamios biodegradables, debido a que es un poliéster semicristalino, aprobado por la FDA para varias aplicaciones biomédicas, como liberación de fármacos, suturas y andamios para reparación de tejidos.

Varios métodos han sido investigados para la fabricación de andamios biodegradables a partir de PLA. Uno de estos métodos es la técnica de AJS. En el hilado, las nanofibras son depositadas capa por capa conformando varios tamaños de fibra, con un rango de diámetro de 25 nm hasta más de 500µm, y con una alta porosidad. Las fibras hiladas son atractivas debido a que los andamios fibrilares pueden imitar la nanomorfología estructural de la matriz extracelular tanto en orientación alineada como aleatoria, la cual es clave en la regeneración tisular del órgano a regenerar (1).

Gran parte de la literatura indica que la presencia de la biopelícula, especialmente en las membranas expuestas, puede interferir con la regeneración periodontal y conducir a una disminución del éxito clínico debido al metabolismo celular limitado. Además, hay datos que indican que la disminución de la carga de biopelículas puede llevar a mejorar los resultados clínicos y una regeneración más predecible. Por lo tanto, la colocación de injertos óseos y membranas en los sitios infectados puede limitar el éxito de la regeneración periodontal.

La aplicación local de antimicrobianos de liberación controlada es fácil de usar y puede mejorar potencialmente el resultado clínico después de la cirugía guiada de regeneración tisular. Un ejemplo de estos productos que es un suministro localmente y de liberación controlada es el gluconato de CHX (2). Los agentes antimicrobianos incorporados en las membranas periodontales pueden ser una alternativa para resolver el problema de la infección. La bisbiguanida de clorhexidina, es eficaz para reducir la viabilidad de la placa y las bacterias de la misma. La clorhexidina se ha prescrito comúnmente para el control de la placa posquirúrgica en pacientes sometidos a terapia de regeneración tisular guiada, ya que puede reducir y retrasar la acumulación temprana de bacterias en las membranas para regeneración tisular guiada (GTR). Urbani et al. sugirieron que el gel de clorhexidina aplicado a las membranas expuestas, combinado con un tratamiento antibiótico sistémico, podría lograr buenos resultados clínicos. Simion et al. observaron diferencias en la deposición de placa entre las membranas de politetrafluoroetileno (ePTFE) tratadas con clorhexidina y no tratadas. La incorporación de agentes antimicrobianos, como la clorhexidina, en las membranas periodontales puede ser valiosa para controlar la infección asociada a la membrana durante la terapia con GTR (3).

Los materiales bioreabsorbibles que pueden usarse para la fabricación de membranas pertenecen a los grupos de polímeros naturales y/o sintéticos. Los

grupos de polímeros más conocidos utilizados con fines médicos son los poliésteres alifáticos y el colágeno (4).

Los materiales más comunes para la fabricación de membranas comerciales son el colágeno (reabsorbibles) y PTFE (no reabsorbibles), para las membranas reabsorbibles también pueden utilizarse materiales poliméricos, son menos utilizados y más investigados en la actualidad, la gran ventaja de los mencionados es que pueden ser combinados y mejorar sus propiedades mecánicas. Algunos ejemplos de polímeros utilizados son: Colágeno obtenido de diferentes fuentes (pescado, bovino, porcino), Acetato de polivinilo (PVA), Gelatina (tipo A-B), Ácido polil-láctico (PLA), Policarpolactona (PCL) (5).

Para la fabricación de fibras poliméricas son utilizadas dos técnicas principales, electrohilado y propulsión de gas, la primera se basa en la disposición de fibras por medio de un circuito cerrado y se deben de tener consideraciones de voltaje. La técnica de propulsión de gas tiene la ventaja de ser libre de voltaje lo que la vuelve más sencilla y económica.

Las membranas reabsorbibles son una mejor opción para evitar segundas intervenciones, sin embargo, ninguna de las membranas comerciales presenta un agente antimicrobiano para asegurar una disminución en la carga bacteriana durante una exposición de la membrana o infección secundaria. Los polímeros de acuerdo a su porcentaje de síntesis y peso molecular le pueden conferir mejores propiedades mecánicas a las membranas por lo que son de mucho interés para la fabricación de nuevos materiales.

Por lo que el propósito de este estudio es fabricar por medio de la técnica de hilado por propulsión de gas andamios membranosos y fibrilares a partir de una solución de PLA con CHX, caracterizarlo química y biológicamente con posibles aplicaciones periodontales futuras.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1 Estructura del tejido periodontal

El tejido periodontal rodea y soporta la estructura dental, consiste en 4 componentes: gingiva, cemento, hueso alveolar y ligamento periodontal. La gingiva es una membrana mucosa que cubre el borde de la mandíbula que contiene a los dientes. El esmalte de la corona y el cemento radicular coinciden en el margen gingival (unión cemento-esmalte), y el espacio entre estas estructuras es denominado surco gingival. El cemento es un tejido duro que cubre la dentina radicular y ancla las fibras del ligamento periodontal (LPD) de un lado. El otro lado de la interfaz del ligamento periodontal está en contacto con el hueso alveolar. El hueso alveolar, que tiene propiedades similares al hueso de cualquier parte del cuerpo, soporta a los dientes y al tejido gingival. El hueso alveolar del lado de la raíz consiste en una pequeña capa de hueso denso compacto, apareciendo como una línea radiopaca delgada rodeando la raíz, llamada lámina dura, en donde las fibras de Sharpey del ligamento periodontal se insertan profundamente.

El LPD consiste en fibras de colágeno (primarias) orientadas funcionalmente, fibras elásticas (secundarias), que tienen una orientación vagamente anárquica dispuesta alrededor de los vasos, las fibras de reticulina y oxitalan, los vasos sanguíneos, linfáticos, y nerviosos. Como unidad funcional, el LPD provee fijación dental en el alveolo a través del tejido conectivo denso y es usualmente expuesto a fuerzas mecánicas durante la oclusión y masticación. El estímulo funcional de las fuerzas mecánicas y de masticación hacia el LPD y hueso alveolar juegan un rol importante en las propiedades biológicas de las células periodontales para mantener la salud fisiológica (6).

2.2 Enfermedad periodontal

El término enfermedad periodontal (EP) engloba una gran variedad de condiciones inflamatorias crónicas de la gingiva. Empieza con gingivitis, inflamación localizada de la encía que es iniciada por diferentes vías; asociado únicamente a biofilm dental, mediado por factores de riesgo locales y/o sistémicos, agrandamiento gingival influenciado por fármacos u otros factores no inducidos por biofilm (genéticos, desarrollo de desórdenes, infecciones específicas, condiciones inmunes e inflamatorias, procesos reactivos, neoplasias, endocrinos, nutricionales y desórdenes metabólicos, lesiones traumáticas y pigmentación gingival). La periodontitis crónica ocurre cuando la gingivitis no es tratada y progresa a la pérdida de encía, hueso y ligamento, que crea la profundidad periodontal “bolsas”, que son un sello distintivo de la enfermedad y pueden conducir eventualmente a la pérdida de dientes. La EP puede contribuir a la carga inflamatoria general del cuerpo (7). La periodontitis fue reclasificada como crónica, agresiva (localizada y generalizada), necrotizante y como manifestación de enfermedades sistémicas. Al igual encontramos estadios y grados de la enfermedad periodontal, los estadios contienen cuatro categorías (periodontitis inicial, moderada, severa con potencial

adicional de pérdida dental y severa con potencial para pérdida de dentición). Los grados involucran tres niveles (grado A-riesgo bajo, grado B- riesgo moderado, grado C- riesgo alto con progresión) y en adición abarca aspectos relacionados a la progresión de la periodontitis, estatus general de salud y otros factores como fumar, aterosclerosis o niveles metabólicos para el control de la diabetes. Estos grados permiten al clínico incorporar factores individuales del paciente dentro del diagnóstico, que es crucial para comprender el manejo del caso.

La nueva clasificación de enfermedad periodontal también incluye las enfermedades sistémicas que afectan al tejido de soporte periodontal, y condiciones adquiridas como lo son las condiciones periodontales (abscesos periodontales, lesiones endodónticas-periodontales), tales como deformidades mucogingivales y condiciones alrededor del diente (fenotipo gingival, encía/ recesión de tejido blando, pérdida de papila, disminución de la profundidad vestibular, frenillo aberrante/ posición muscular, excedente gingival, color anormal y condición superficial de raíz expuesta), fuerzas oclusales traumáticas (trauma oclusal primario, secundario y fuerzas ortodónticas), prótesis y dientes relacionados a factores que modifican o predisponen la placa induciendo enfermedades gingivales/ periodontitis (Factores localizados relacionados al diente, factores localizados relacionados a la prótesis dental). Un paciente con gingivitis puede revertir a un estadio de salud, mientras que un paciente con periodontitis permanece con la enfermedad de por vida, inclusive con el éxito de la terapia, necesitando un cuidado recurrente definitivo para evitar una recidiva de la enfermedad.

También se incluye un apartado para la periimplantitis, debido al incremento del número de implantes dentales en la población, la cual fue definida como la condición patológica asociada a placa que ocurre en los tejidos circundantes al implante dental, caracterizado por inflamación en la mucosa periimplantaria y una pérdida ósea subsecuente. Se asume que la mucositis precede a la periimplantitis. La enfermedad periimplantaria y sus condiciones es dividida en tres, mucositis periimplantaria, periimplantitis y deficiencias periimplantarias de tejido suave y duro (8).

2.3 Defectos óseos periodontales

Basado en observaciones clínicas los defectos óseos ocasionados por la enfermedad periodontal pueden ser clasificados como:

- Supraóseo o supracrestal: cuando la base del defecto es localizada coronal u oclusal a la cresta ósea.
- Infraóseo o subcrestal: cuando la terminación apical del defecto se localiza debajo de la cresta ósea. Un defecto infraóseo puede ser subdividido a defectos intraóseos cuando el componente subcrestal involucra la superficie radicular de un solo diente y cráter cuando el defecto afecta la superficie de dos raíces adyacentes en igual medida.

Un defecto intraóseo puede ser subclasificado, con respecto al número a las paredes óseas remanentes, en tres categorías: defecto de 1 pared, 2 paredes, 3 paredes. Goldman en 1958 (9).

Los compromisos de furcación también pueden incluirse en el grupo de defectos óseos periodontales. Uno de los sistemas de clasificación más reciente para defectos fue introducida por Glickman en 1953, que toma en consideración la dimensión vertical y horizontal de la pérdida ósea. Tarnow y Fletcher en 1984 (10), también sugirieron una clasificación para la elevación del componente vertical para cada tipo defecto de furcación horizontal, medido a partir del fórnix o techo de la furca.

Otra clasificación propuesta por Hamp et. al. en 1974 (11). Es actualmente la más comúnmente utilizada debido a su simplicidad clínica:

- Grado I: Pérdida ósea horizontal, no excediendo el tercio del ancho dental.
- Grado II: Pérdida ósea horizontal, excediendo el tercio del ancho dental pero no involucra el ancho total de la furcación.
- Grado III: Destrucción ósea de las 4 paredes y de la furcación (12).

2.4 Estructura de la matriz extracelular nativa

En todos los organismos multicelulares, las células son estructuralmente soportadas dentro de un andamio complejo y bioactivo, que se conoce como matriz extracelular (MEC).

La MEC es un material relativamente estructural estable que también está involucrado en dictar el destino de la célula como la migración, diferenciación y apoptosis. Las células generan los componentes macromoleculares de la MEC y controlan su ensamblaje. La MEC se compone de una mezcla compleja de proteínas y polisacáridos, los cuales están dispuestos de una manera específica que da a los tejidos sus propiedades (13). La MEC nativa es el andamio biológico ideal, ya que contiene todos los componentes del tejido del que se derivó, excepto para las células vivas (14).

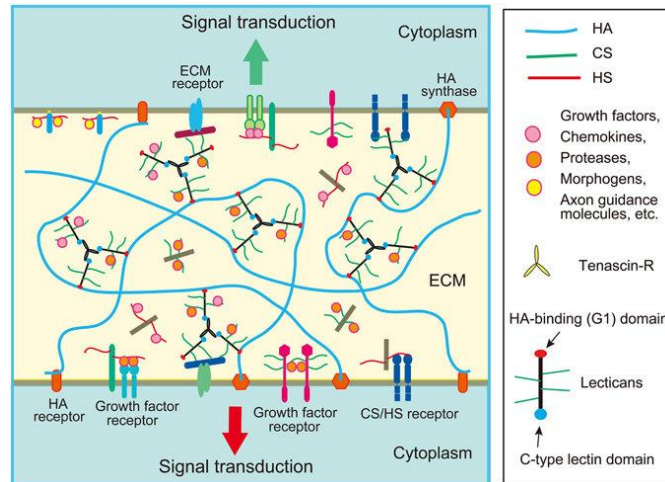


Fig. 1. Esquema de los componentes proteicos, proteoglicanos y polisacáridos de la MEC junto con receptores celulares (integrinas) (15).

La naturaleza de la MEC es altamente personalizada y ofrece muchos tipos de señales específicas de tejido, incluyendo la incorporación de sus mismas propiedades mecánicas, dando señales bioactivas al microambiente, actuando como un reservorio para factores de crecimiento y susceptibilidad a la degradación para proliferación celular y neovascularización (16). El colágeno constituye > 90% del peso seco de la mayoría de la MEC y 28 tipos de colágeno adicionales y distintos han sido identificados con funciones biológicas especializadas. Estos diferentes tipos de colágeno proporcionan una amplia gama de propiedades mecánicas y estructurales para la MEC y contienen ligandos que interactúan con las células. En el cuerpo, la distribución y asociación del colágeno con otras proteínas es el resultado de los patrones de expresión genética de las células a medida que se desarrollan y se diferencian en órganos y tejidos. La alta complejidad de estas asociaciones naturales entre moléculas crea dificultad al recrear artificialmente esta delicada estructura para la bioingeniería. La segunda proteína más abundante en el cuerpo es la fibronectina siendo rica en subunidades como arginina-glicina-aspartato (RGD), la fibronectina puede existir tanto en tejidos como en isoformas solubles y contiene ligandos para la adhesión de muchos tipos celulares diferentes (17). La MEC también se compone de una gran mezcla de glicosaminoglicanos (GAG), que se unen a los factores de crecimiento y mejoran la retención de agua.

2.5 Biocompatibilidad

La biocompatibilidad es un campo que primero atrajo la atención de los investigadores en la década de 1940, en el contexto de los implantes médicos y sus interacciones benéficas y dañinas con el cuerpo. En 1987, la biocompatibilidad se definió formalmente como "la capacidad de un biomaterial para realizar una aplicación específica con una respuesta apropiada en el huésped" (18). En 2010, Kohane y Langer explicaron la biocompatibilidad en un nuevo contexto y lo

redefinieron como "una expresión de la benignidad de la relación entre un medio material y su entorno biológico (18,19). Existe una amplia variedad de biomateriales que se utilizan en la ingeniería de tejidos, que generalmente pueden clasificarse como materiales naturales, derivados de autólogos (20), alogénicos (xenogénicos) (21) y materiales sintéticos, o una mezcla de ambos tipos llamados materiales híbridos (22,23). Estos materiales pueden ser procesados y manipulados de manera que tengan propiedades funcionales que forman andamios porosos que se pueden usar para la restauración o modificación de tejidos. Estas propiedades funcionales son los objetivos finales de los dispositivos basados en biomateriales *in vivo* e incluyen: restauración del tejido con función apropiada y expresión celular fenotípica, inhibición de las respuestas de células gigantes de macrófagos y cuerpos extraños que degradarán el material, inhibición de la formación de cicatrices que pueden inhibir la función del biomaterial y, por último, la inhibición de las respuestas inmunes que podrían destruir la funcionalidad del dispositivo (24).

El objetivo de evaluar la biocompatibilidad de cualquier material es determinar cualquier efecto tóxico para el cuerpo. Por lo tanto, un biomaterial debe ser evaluado para determinar las respuestas biológicas que podrían causar daño o efectos secundarios no deseados al huésped.

2.6 Ingeniería de Tejidos

El diseño de los materiales busca la interacción con el tejido de forma específica, mediante estímulos a nivel celular y molecular, así como la combinación de las propiedades de bioabsorción y bioactividad dentro del mismo. En la actualidad estos biomateriales son denominados de tercera generación, los cuales se utilizan para suplantar la función de algún órgano lesionado y deben desaparecer durante el periodo de recuperación del tejido. Normalmente las especies implicadas para la evaluación y desarrollo de biomateriales en la ingeniería de tejidos son células vivas y componentes extracelulares que participan en el desarrollo de dispositivos que permitan estimular o favorecer la reparación o restauración de un órgano o tejido dañado. Los polímeros sintéticos bioreabsorbibles con capacidad de degradarse, gracias a reacciones de hidrólisis, en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo y eliminarse completamente por vías metabólicas, son los materiales más atractivos para la elaboración de andamios en ingeniería de tejidos. De esta manera los andamios pueden soportar el crecimiento de tejidos completamente naturales creados por el propio organismo, evitando los problemas de infección y formación de tejido fibroso, que se encuentran muy asociados a los materiales permanentes (25).

Existen criterios ideales de diseño para un andamio en la ingeniería de tejidos: 1) la superficie debe permitir la adhesión celular, promover crecimiento celular, y permitir la diferenciación, 2) el andamio debe ser biocompatible, ni el polímero y sus subproductos deben provocar inflamación o toxicidad *in vivo*, 3) el andamio debe ser biodegradable y eventualmente eliminado; 4) la porosidad debe ser suficiente para proveer espacio para la adhesión celular, regeneración de matriz extra celular, distribución celular para facilitar formación homogénea del tejido, 5) el material debe

ser reproducible y procesable en tres dimensiones y con características especiales (26).

2.7 Requisitos para un exitoso desarrollo en ingeniería de tejido

Como fue reportado por los pioneros Langer y Vacanti, el termino ingeniería de tejidos (IT) es definido como “un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y la ciencia de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan, o mejoren el tejido o la función del órgano” (27).

El objetivo general de la IT en la actualidad es el desarrollo temporal de andamios multicomponentes en 3D biocompatibles que soporten y puedan ser insertados en un tejido para su reparación o corregir un defecto, permitiendo la adhesión y proliferación de un específico tipo de célula o en su defecto varios, también llamados composites, para inducir una regeneración fisiológica o funcional de los tejidos (hueso), superando las desventajas de los biomateriales que se encuentran en el mercado actualmente (28–30). El termino andamio ha sido adoptado para indicar un biomaterial el cual puede proveer soporte. Soporte es utilizado para describir un biomaterial como una plataforma biológica que facilita una apropiada reparación y restauración de las características fisiológicas e histológicas de heridas en los tejidos dañados durante el proceso de curación.

Un andamio biocompatible debe permitir la adhesión e inducir la proliferación y diferenciación celular sin desencadenar ninguna reacción en la respuesta inflamatoria o rechazo del cuerpo.

Con la fusión de ingeniería de tejidos y ciencias de los materiales y a el papel activo de la MEC descrito anteriormente, la definición de biomateriales ha pasado de un material inerte a:

“Un andamio o matriz para un producto de ingeniería tisular se refiere a la capacidad de actuar como un sustrato que soportará la actividad celular apropiada, incluyendo la facilitación de sistemas de señalización molecular y mecánica, con el fin de optimizar la regeneración tisular, sin provocar ninguna respuesta local o sistémica indeseable en el huésped final” (31).

Hay una enorme variedad de biomateriales y andamios, hechos de polímeros capaces de encapsular células, de mitigar las respuestas inmunitarias, de regenerar los tejidos o incluso de actuar como barrera entre los tejidos (32).

2.8 Antisépticos locales.

Los diferentes tipos de heridas requieren diferentes tipos de cuidados y tratamientos, la mayoría de las infecciones de las heridas quirúrgicas se presentan en el curso de 5 a 10 días (33). La herida quirúrgica, es un proceso localizado que debe controlarse de forma efectiva, con el objetivo de lograr una cicatrización sin complicaciones, y prevenir la infección (34). Esto se puede lograr mediante la utilización de sistemas de liberación controlada de fármacos. El uso de este tipo de

poco probable el desarrollo de resistencia bacteriana. El mecanismo de acción está asociado con la atracción entre la clorhexidina (catión) y las negativamente cargadas células bacterianas. Después que la clorhexidina es absorbida dentro de la pared celular del organismo, logrando la disrupción de integridad de membrana celular, causando un rompimiento de los componentes intracelulares del organismo bacteriano (37,42).

El uso de la clorhexidina se ha extendido en aplicaciones clínicas y comerciales, la seguridad del paciente es de suma importancia, y en consecuencia el riesgo de eventos adversos como agente antiséptico de la clorhexidina cae de raros a infrecuentes. Adicionalmente se ha demostrado su superioridad contra otros agentes antisépticos para disminuir el riesgo de infecciones del sitio quirúrgico (38,43).

La clorhexidina es usada normalmente en concentraciones entre 0.12% y 2.0%. A estas concentraciones tiene un nivel de toxicidad tisular extremadamente bajo, tanto local como sistémicamente. La clorhexidina al 2% se ha utilizado como irrigante subgingival, sin una aparente toxicidad a los tejidos gingivales. Las reacciones alérgicas a la clorhexidina son raras en la población general, solo algunos casos reportados de reacciones anafilácticas (44).

Los efectos adversos son raros, han sido reportado algunos casos, tales como lo fue en el Ministro Japones de Walfare entre los años de 1967 y 1984, y 26 casos de las agencias danesas entre 1968 y 2000, y otros 182 por el Comité médico y de seguridad de Reino Unido entre 1965 y 1996. La clorhexidina es utilizada como ingrediente de varios productos dentales, puede presentar algunos inconvenientes no muy comunes como pigmentación dental, disminución de la sensación del gusto, formación de cálculos salivales (45).

Tabla 1. Propiedades Físico Químicas de la clorhexidina.(46)

Propiedad	Valor	Interpretación:
Peso Molecular	897.762 g/mol	Suma de todos los átomos que la componen
LogP	2.71	Coefficiente de reparto (proporción entre las concentraciones de un compuesto no-ionizado entre dos solventes octano/agua)
Hidrógenos donadores de enlace	18	Número de hidrógenos donadores

Hidrógenos aceptores de enlace	16	Número de hidrógenos aceptores
Masa mono-isotópica	896.32 g/mol	Uso espectrómetro de masas
Área Topológica de la superficie polar	455 A ²	La suma de todas las superficies de los átomos polares. (Ejemplo una superficie mayor a 140 Angstroms cuadrados tiene una pobre permeabilidad de las membranas celulares.
Descripción física	liquido	Presentación del Digluconato
Punto de fusión	258-260	
Solubilidad	En Agua: 800 mg/L 0.0261 mg/mL	Merk Index 1996 HMBD
Descomposición	Cloroanilina	A temperaturas altas se descompone en cloroanilina y la presencia de materia orgánica no la inactiva.
Constantes de disociación	pKa1= 10.8 (25°C)	Es el pH en el cual el compuesto se encuentra el 50% ionizado y el otro 50% no ionizado (penetra a la célula)
Toxicidad	LD50= 2g/kg (humano oral) LD50= 3g/kg (rata) LD50= 1g/kg (humano subcutaneo)	Toxicidad a nivel tisular muy baja.

2.10 Ácido Poli-láctico (PLA)

El PLA es uno de los polímeros sintéticos más utilizados en el campo de la biomedicina. El PLA es producido por policondensación del ácido láctico o por la apertura del anillo de polimerización del dimero cíclico de lactida. Es uno de los polímeros biodegradables más prometedores debido a sus propiedades mecánicas, procesamiento termoplástico y propiedades biológicas, al igual que su

biocompatibilidad y biodegradabilidad. Los productos de degradación de la polilactida no son tóxicos, confiriéndole una aplicación biomédica.

El ácido láctico ($\text{HOCH}_2\text{CHCOOH}$) es una molécula quiral simple el cual existe como dos enantiómeros, L- y D-ácido láctico.

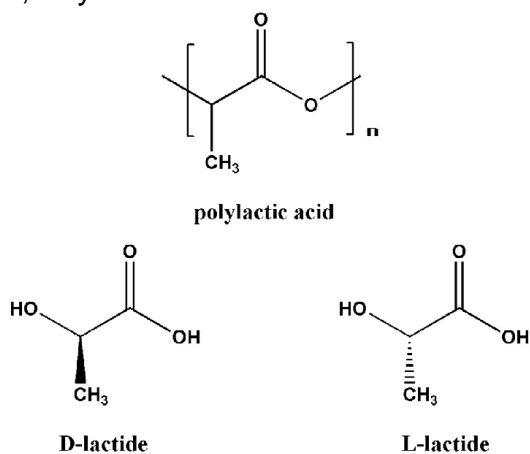


Fig. 3 Isómeros ópticos del ácido láctico.(47)

La regulación de dispositivos de PLA por la FDA ha incrementado el interés por su uso en la ingeniería de tejidos. Las nanofibras de PLA tienen una gran aplicación, no solo como andamios sino también como vehículos de liberación de fármacos. El método más simple para cargar el fármaco al polímero es a través de la absorción directa a la superficie de las fibras, permitiendo una interacción (fuerzas de Van der Waals o electroestáticas) entre la matriz polimérica y el fármaco. La difusión del fármaco está dada por la superficie del polímero, por su alta porosidad y el área de superficie. Fármacos hidrofóbicos que son solubles en solventes orgánicos pueden ser mezclados directamente a la solución de PLA (48)(49).

2.11 Sistemas de liberación sostenida

Liberación local y sostenida de agentes antimicrobianos es un nuevo concepto para el tratamiento de infecciones recurrentes y crónicas debido al incremento de concentración del fármaco en el sitio de infección, esto podría reducir la necesidad de la administración de fármacos sistémicos y así evitar efectos secundarios.

El uso excesivo de antibióticos puede ocasionar una resistencia bacteriana, por lo que otras estrategias son requeridas. Una alta concentración es esencial para eliminar inicialmente a la bacteria y una liberación sostenida a largo plazo previene, infecciones secundarias. La falta de esto puede llevar a la formación de biofilm que a menudo son más resistentes a los fármacos.

Por lo tanto, muchos sistemas de liberación, como nanopartículas, macropartículas, nanogeles, esponjas, membranas y nanofibras, han sido desarrolladas para la liberación de agentes antimicrobianos, entre los cuales, las fibras son adecuadas para la liberación de fármacos, debido a su diámetro pequeño, área de superficie específica grande y superficies funcionalizadas.

El PLA es particularmente atractivo para la producción de fibras, debido a su buena estabilidad mecánica, excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad, y a su uso actual en aplicaciones biomédicas (50).

2.12 Técnica de hilado por propulsión de gas (AJS)

AJS es realizada independientemente de contraindicaciones electroestáticas y limitantes del solvente debido a la constante dieléctrica y puede ser aplicable para cualquier polímero sensible a voltaje (51).

Esta técnica se basa en el uso de un gas a presión (aire, nitrógeno u argón) que se dispensa a una velocidad extrema entre los 10 a 35 *psi* con el fin de estirar la solución polimérica en forma de fibras finas en la salida de la boquilla del aerógrafo. Las fibras se forman debido a que en el mismo instante que se eyecta la solución polimérica de la punta, el disolvente comienza a evaporarse debido a que el gas propulsor compite por el oxígeno y continúa haciéndolo después de que las fibras se han depositado sobre el colector. Debido a la rápida y barata tasa de producción de fibras, se han probado una gran variedad de polímeros sintéticos y biopolímeros, entre los que encontramos el PLA (26).

2.13 Técnica de caracterización del material.

2.13.1 Espectrometría infrarroja transformada con Fourier (FTIR)

Descripción de la técnica.

La espectrometría infrarroja transformada con Fourier (FTIR) es una técnica analítica utilizada para identificar materiales orgánicos y en algunos casos inorgánicos. Esta técnica mide la absorción de la radiación infrarroja a través del material de muestra frente a la longitud de onda. Las bandas de la absorción infrarrojas identifican estructuras y compuestos moleculares.

Cuando un material es irradiado con radiación infrarroja, la radiación IR absorbida suele excitar moléculas en un estado vibracional más alto. La longitud de onda de la luz absorbida por una molécula particular es una función de la diferencia de energía entre los estados de vibración en reposo y excitado. Las longitudes de onda que son absorbidos por la muestra son características de su estructura molecular.

La espectrometría FTIR utiliza un interferómetro para modular la longitud de onda de una fuente infrarroja. Un detector mide la intensidad de luz transmitida o reflejada acorde a su longitud de onda. La señal obtenida del detector se llama interferograma, el cual debe analizarse con un ordenador mediante transformadas de Fourier para obtener un espectro infrarrojo de haz único. Los espectros FTIR se suelen presentar como gráficos de intensidad frente a un número de onda (en cm^{-1}). Siendo la longitud de onda su recíproco. La intensidad puede ser trazada con un porcentaje de transmitancia de luz o absorbancia en cada número de onda.

Identificación cualitativa del material. Para que la identificación del material pueda ser analizada, el espectro de la absorbancia desconocida del IR es

comparado con un espectro de una base de datos o el espectro obtenido de un material ya conocido. Las combinaciones de espectros identifican el polímero u otros constituyentes en la muestra. Las bandas de absorción en el intervalo de onda entre 4000-1500 son típicamente debido a grupos funcionales (por ejemplo, -OH, C = O, N-H, CH₃, etc.).

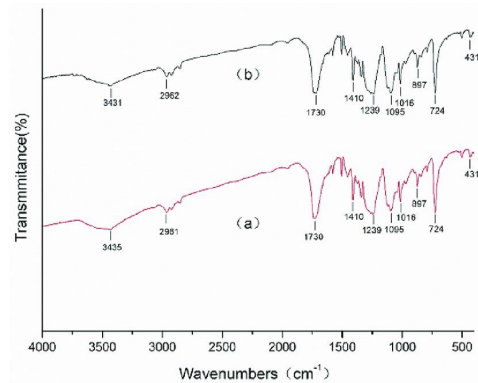


Fig. 4. Ejemplo de un espectro FTIR.(52)

Aplicaciones típicas.

- Identificación de materiales extraños
- Partículas - Fibras - Residuos
- Identificación de compuestos de materiales a granel
- Identificación de componentes en materiales multicapa
- Cuantificación de silicona, ésteres, etc., como contaminación en diversos materiales.

Requisitos de la muestra.

Los requisitos de la muestra varían dependiendo de la forma de la muestra y el instrumento. Las muestras pueden estar en forma líquida, sólida o gaseosa. Cuando se usa un accesorio de microscopio en el espectrómetro, el área de análisis puede ser tan pequeña como 10 μm . Las películas orgánicas delgadas sobre una superficie reflectante (por ejemplo, oro) se pueden analizar in situ usando el modo de reflectancia del microscopio. El exterior de un material (1-10 μm) se puede analizar utilizando reflectancia total atenuada (ATR) (53).

2.13.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectrómetro de dispersión de energía de rayos X (EDS).

La microscopía electrónica de barrido MEB es un método para la obtención de imágenes de alta resolución de superficies. El MEB utiliza electrones para la imagen, al igual que un microscopio de luz utiliza la luz visible. Las ventajas de MEB

sobre la microscopía de luz ultrapermanente es que incluye una ampliación mucho mayor ($> 100.000 X$), al igual que una mayor profundidad de campo hasta 100 veces más en comparación con la microscopía óptica. La información cualitativa y cuantitativa de análisis químico también se obtiene utilizando un espectrómetro de dispersión de energía de rayos X (EDS) con el MEB.

El MEB genera un haz de electrones incidentes en una columna de electrones por encima de la cámara de muestras. Los electrones son producidos por una fuente de emisión térmica, tal como un filamento de tungsteno calentado, o por un cátodo de emisión de campo. La energía de los electrones incidentes puede ser tan baja como 100 eV o tan alta como 30 KeV dependiendo de los objetivos de la evaluación. Los electrones se enfocan en un pequeño haz mediante una serie de lentes electromagnéticas en la columna del MEB. Las bobinas de exploración cerca del extremo de la columna dirigen y colocan el haz enfocado sobre la superficie de la muestra. El haz de electrones se escanea en un patrón sobre la superficie para obtener imágenes. El haz también puede enfocarse en un solo punto o escanearse a lo largo de una línea para el análisis de rayos X. El haz puede ser enfocado a un diámetro final de la sonda tan pequeño como aproximadamente 10 \AA (53).

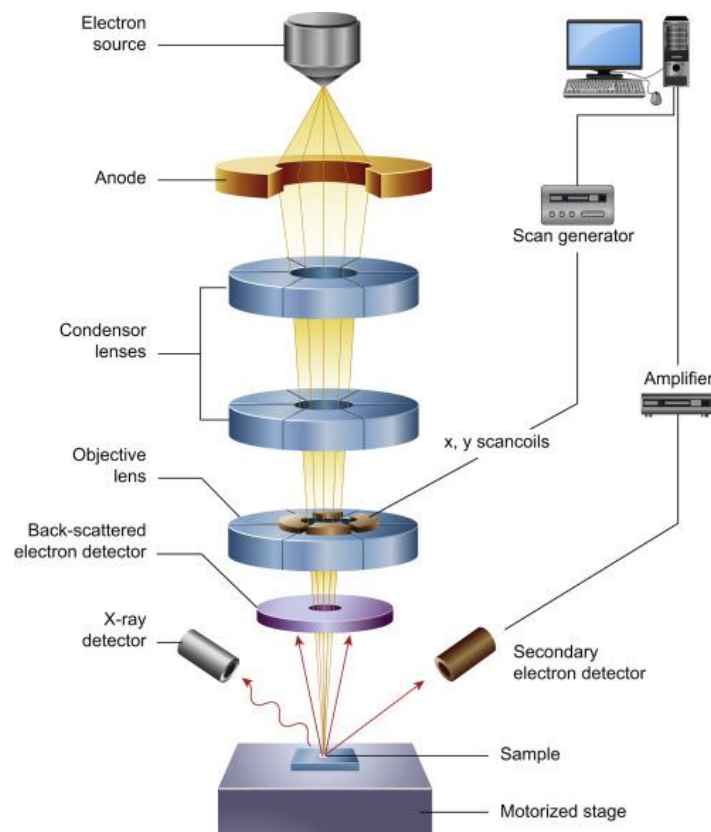


Fig. 5. Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).(54)

3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

a) **Síntesis de nanofibras con Técnica por Propulsión de Gas.**

- Granados y cols. Sintetizaron fibras poliméricas a partir de una disolución de ácido PLA en cloroformo y alcohol etílico anhidro absoluto una razón de 3:1. El aparato de hilado por propulsión de gas se encontraba dentro de una cámara Plexiglás para aislar el sistema de campos externos y evitar cambios en las condiciones durante el proceso de hilado. La producción del andamio se realizó por medio de la técnica de AJS a partir de soluciones poliméricas de PLA a diferentes concentraciones (6, 7, y 10 %) utilizándose un aerógrafo con un diámetro de boquilla de 0.3 mm con una alimentación gravitatoria de la solución para síntesis del andamio. El aerógrafo se conectó a un compresor de aire para el depósito de las fibras se mantuvo constante una presión de 30 *psi* con 15 cm de distancia de la boquilla al colector recubierto con papel encerado (Reynolds). Durante el proceso se determinaron parámetros optimizados de 8 ml de volumen de la solución polimérica con respecto a 30 min de tiempo para la alta calidad del depósito de las fibras (26).

b) **Fibras de ácido poli-láctico obtenidas por propulsión de gas: efecto del solvente en el diámetro fibrilar.**

- Da Silva y cols. obtuvieron fibras de PLA con la técnica de propulsión mediante diferentes solventes, sin embargo, la mayoría son tóxicos y pueden ser dañinos para la salud y el ambiente, el objetivo del trabajo fue evaluar el uso del dimetil carbonato (DMC) un solvente natural para la producción de fibras de PLA, comparándolo con dos solventes más, cloroformo y hexafluoruro-2-propanol (HFP), todos a 3 diferentes concentraciones del polímero 8, 10 y 12%, y la presión a 0.2, 0.4 y 0.6 MPa, para observar el promedio del diámetro fibrilar. Se mostro que el cloroformo y el HFP indicaron una tendencia de reducción en el promedio del diámetro fibrilar cuando la presión disminuye, este comportamiento no se observó para el DMC. Se concluyó que todos los solventes utilizados para este estudio mostraron ser viables para producir fibras de PLA por propulsión promedio de rango fibrilar: (cloroformo: 260–970 nm; DMC: 240–650 nm; y HFP: 220–470 nm), se eligió un nivel de significancia para promedios de $p < 0.05$ (55).

c) **Caracterización biológica *in vitro* e *in vivo* de andamios fibrilares de ácido poli-láctico sintetizados por propulsión de gas.**

- Granados y cols. realizaron la producción de andamios de PLA con la técnica por propulsión de gas. Los resultados mostraron que independientemente de la concentración polimérica de las nanofibras de PLA (7% p/v y 10% p/v) y el tiempo de degradación (0-100 días) son biocompatibles, se muestra una reacción inflamatoria común por el proceso de degradación. En los estudios

in vivo (implantación de andamios en ratas Wistar) no se reportó toxicidad ya que no se encontró respuesta histológica (hematoxilina y eosina) significativa después de los 100 días (evaluación de degradación y fibrosis). La evidencia mecánica (evaluación del módulo de elasticidad y resistencia mediante INSTRON,) indica que los andamios al 7% p/v (78.7 +-6.2MPa) son menos rígidos, por lo tanto, más resistentes al estrés y buenos candidatos para tejidos duros, en contraste con andamios al 10% p/v (26.2 +- 4.0 MPa) que podrían ser aplicados a tejidos suaves. Los andamios fueron evaluados mediante células mesenquimales (Hbm-MSC) hasta 9 días, sus resultados muestran una mejor proliferación estadísticamente significativo $p < 0.05$ en los andamios al 10% después del séptimo día, sin embargo, no se mostró citotoxicidad por parte del material de ningún porcentaje. Ambos porcentajes de membranas fabricadas con la técnica AJS mostraron propiedades físicas y químicas favorables para su aplicación en la ingeniería de tejidos (56).

d) **Influencia del diámetro de andamios membranosos fibrilares en la biocompatibilidad de células estromales mesenquimales hPDL.**

- Suarez y cols. evaluaron la influencia del diámetro fibrilar hacia la biocompatibilidad, discutiendo como la topografía confiere un microambiente para la respuesta de biocompatibilidad en células de ligamento periodontal mesenquimales (hPDL) apoyado por la adhesión, la interacción de las células y la viabilidad celular. En este estudio se observó que la morfología, geometría y topografía de las fibras de PLA es afectada por la concentración de la solución polimérica preparadas con la técnica por propulsión de gas al 6, 7 y 10%. Analizadas mediante SEM (6% $0.880 \pm 0.53 \mu\text{m}$, 7% $0.675 \pm 0.26 \mu\text{m}$, 10% $0.704 \pm 0.29 \mu\text{m}$), AFM ($0.042 \pm 0.019 \mu\text{m}$ / $0.273 \pm 0.122 \mu\text{m}$) y FTIR (bandas en 1,740, 1,183, 1,148 and 1,074 cm^{-1}). Se evaluó la biocompatibilidad (adhesión, proliferación e interacción celular). Las fibras se sintetizaron de dos maneras homogéneas y aleatoriamente, esta última orientación mostró mejores resultados celulares. Además, esta característica de nanofibras aleatorias depende de la concentración ya que las células sembradas en el andamio tuvieron interacciones apropiadas con su entorno, se adhirieron y proliferaron mejor en un 10% seguido de un 7 y 6% de PLA ($p < 0.05$) (57).

e) **Matrices poliméricas cargadas con clorhexidina**

- Chen y cols. prepararon andamios de microfibras con acetato de celulosa como polímero base, CHX como agente bactericida, TTE (titanato orgánico) como reticulante y una pequeña cantidad de PEO (óxido de polietileno) de alto peso molecular para facilitar el electrohilado. Estudiaron el efecto bactericida de estos andamios frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas llegando a la conclusión de que estas fibras tenían capacidad antibacteriana para ambos tipos de bacterias ($p < 0.05$) (58).

- Nan y cols. sintetizaron fibras de PLLA (ácido de polilactida) cargadas con CHX que caracterizaron vía SEM y después analizaron su capacidad para la inhibición del crecimiento bacteriano llegando a la conclusión de que la CHX contenida en estas fibras responde a una liberación programada inhibiendo el crecimiento bacteriano ($p < 0.05$) (59).
- Llorens y cols. incluyeron un agente antimicrobiano PHMB, un polímero de peso molecular bajo relacionado con la clorhexidina (CHX), en micro/nanofibras de PLA con la técnica de electrohilado con el propósito de evaluar el potencial de aplicación de nuevos materiales como andamios temporales. PLA con CHX fue utilizado como control. Las fibras fueron analizadas mediante SEM (incremento tamaño de fibra ya cargadas de 565 a 610 nm), FTIR, DSC (diferencia entre 550 and 1600 nm), FTIR y mediciones de ángulo de contacto. La liberación del PHMB y CHX de los andamios y su actividad antibacteriana también fueron evaluadas. El FTIR mostró una señal de grupo biguanida similar para la CHX y PHMB en la región de 1550-1450 cm^{-1} , se observaron bandas similares correspondientes a PLA en todas las muestras. En las propiedades térmicas la CHX y el PHMB no afectaron la transición vítrea o las temperaturas de fusión. La PHMB inhibió significativamente ($p < 0.05$) la actividad antimicrobiana contra bacterias, de igual manera su biocompatibilidad fue evaluada encontrando una proliferación y adhesión significativa con líneas celulares de fibroblastos y epiteliales (60).

4. PLANTEAMIENTO Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Uno de los problemas más comunes dentro de la regeneración de tejidos periodontales es el fracaso de los materiales utilizados durante la colocación y el periodo de regeneración debido a la colonización de bacteriana.

Los tratamientos convencionales previos a la regeneración tisular requieren de una administración sistémica de fármacos con el propósito de eliminar sitios de infección, con la desventaja de efectos secundarios no deseados y un incremento en la dosis. Dichos fármacos reportan tener cierta citotoxicidad a concentraciones elevadas disminuyendo de esta manera su especificidad.

En la actualidad la ingeniería de tejidos permite fabricar biomateriales con objetivos particulares, funcionalizándolos con diferentes biomoléculas para un mecanismo personalizado. Un ejemplo de dichos materiales son los polímeros biodegradables que cuentan con características para poder ser cargados con sustancias o drogas que pueden proporcionar una liberación local y sostenida del fármaco o sustancia con una subsecuente disminución en la concentración sistémica. Dichos biomateriales deben de ser biocompatibles y no presentar citotoxicidad, permitiendo un desarrollo celular normal para que se pueda llevar a cabo la reparación tisular.

Lo anterior nos lleva a la siguiente:

¿La caracterización de la síntesis de los andamios de ácido poliláctico/clorhexidina muestra estabilidad química y biocompatibilidad?

5. JUSTIFICACIÓN

Debido a sus características y su similitud con la matriz extracelular, las nanofibras poliméricas son biomateriales utilizados con diferentes objetivos para la regeneración periodontal o de diferentes tejidos, dependiendo de la química de la síntesis y características bioactivas otorgadas. Siendo estos de gran utilidad en el campo biomédico. Con el propósito de desarrollar biomateriales con nuevas aplicaciones, en el presente trabajo se propone una síntesis y caracterización química y biológica de andamios membranosos de PLA/CHX con una liberación localizada y controlada del fármaco con la técnica AJS, con el fin de evaluar biocompatibilidad celular y estabilidad del biomaterial para pensar en aplicaciones tisulares futuras como lo es en pacientes con enfermedades periodontales, periimplantarias y regeneraciones tisulares guiadas, ya que el andamio permitiría una regeneración tisular mientras se mantiene un antimicrobiano activo con sustentabilidad, permitiendo un incremento en la tasa de éxito del tratamiento, logrando de esta manera la reparación del tejido, obteniendo grandes beneficios como los son; evitar dos actos quirúrgicos, indicación de dosis altas de antibióticos, efectos secundarios sistémicos y generar un efecto local adecuado.

6. HIPÓTESIS

H1. La caracterización de la síntesis de los andamios nanofibrilares de ácido poliláctico/clorhexidina presenta estabilidad química y biocompatibilidad.

H0. La caracterización de la síntesis de los andamios nanofibrilares de ácido poliláctico/clorhexidina no presenta estabilidad química y biocompatibilidad.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar andamios nanofibrilares de ácido poliláctico/clorhexidina.

7.2 Objetivos particulares o específicos

- Sintetizar andamios poliméricos de PLA/ CHX por medio de la técnica de hilado por propulsión de gas cargada a diferentes concentraciones (0.1%, 0.2%, 0.4%, 1%).
- Realizar la caracterización morfológica de los andamios nano-fibrilares mediante SEM.
- Realizar la caracterización química de los andamios nano-fibrilares mediante EDS y FTIR.
- Evaluar mediante ensayos de adhesión y proliferación, la actividad celular de osteoblastos humanos fetales (hFOB) con los andamios de PLA/ CHX.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio Experimental *in vitro*, Analítico y Prospectivo.

8.2 Población y muestreo

No probabilístico por conveniencia, que cumplan con los criterios de inclusión.

8.3 Criterios de selección

Criterios de Inclusión: Membranas que cuenten con una buena configuración morfológica.

Exclusión: Membranas dañadas durante la manipulación.

Eliminación: Membranas contaminadas durante los experimentos de caracterización.

Tabla 2. Variables dependientes e independientes

Variables dependientes	Definición conceptual	Escala	Operacional	Prueba estadística
Proliferación celular	Crecimiento de las células a través de mitosis.	(Numérica) nm	Ensayo de Viabilidad Celular (Espectrofotómetro)	ANOVA Tukey
Adhesión celular	Unión de las células sobre la superficie del material.	(Numérica) nm	Ensayo de Adhesión Celular (Espectrofotómetro)	ANOVA Tukey
(SEM) Microscopía electrónica de barrido	Resolución de superficie por medio de electrones.	(Numérica) μm	Diámetro fibrilar	Estadística descriptiva
(EDS) Espectrometría de dispersión de Energía de rayos x	Análisis de composición química elemental	Porcentual %	% Atómico	Estadística descriptiva

(FTIR) Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier.	Identifican componentes moleculares y estructuras.	Identificación molecular	Identificación de bandas y enlaces	NO APLICA
Variables independientes	Definición conceptual	Escala	Tipo de medición	Prueba estadística
PLA 10 %	Polímero Sintético del andamio	Porcentual %	%= p/v (micropipeta-balanza analítica)	NO APLICA
PLA 10%- Clorhexidina 0.1%	Polímero Sintético del andamio con antimicrobiano	Porcentual %	%= p/v (micropipeta-balanza analítica)	NO APLICA
PLA 10%- Clorhexidina 0.2%	Polímero Sintético del andamio con antimicrobiano	Porcentual %	%= p/v (micropipeta-balanza analítica)	NO APLICA
PLA 10%- Clorhexidina 0.4%	Polímero Sintético del andamio con antimicrobiano	Porcentual %	%= p/v (micropipeta-balanza analítica)	NO APLICA
PLA 10%- Clorhexidina 1%	Polímero Sintético del andamio con antimicrobiano	Porcentual %	%= p/v (micropipeta-balanza analítica)	NO APLICA

8.4 Concordancia y fiabilidad

Se realizó una capacitación para realizar las técnicas de caracterización biológicas (Adhesión y Proliferación), así como la lectura de los resultados con el espectrofotómetro (ChroMate, Awareness Technology), también el manejo y lectura del equipo para FTIR (Vertex 70, Bruker). No se llevó a cabo la capacitación para el uso del equipo de las caracterizaciones MEB y EDS (Vertex 70, Bruker) debido a que este se manipulo por un experto en su uso.

8.5 Ubicación espacio temporal.

El proyecto de investigación se llevó a cabo en el Centro de Innovación y Competitividad y Transferencia de Tecnología (CUVYyTT) BUAP, Laboratorio de Bioingeniería de tejidos, DEPEL, Facultad de Odontología, División de Estudios de Posgrado e Investigación, UNAM y en el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC), UCR.

8.6 Diseño de los andamios.

Los andamios de PLA/CHX fueron sintetizados mediante la técnica de hilado por propulsión de gas, siguiendo los parámetros descritos a continuación: El PLA con un peso molecular de 192,000 fue adquirido de la compañía Nature Works. Se llevó a cabo una solución al 10% de PLA peso/volumen (10 gramos de PLA) disuelta en 70 ml de cloroformo. Esta solución posteriormente se mezcló con 30 ml de etanol para mantener un volumen final de 100 ml y una razón de 3 a 1 volumen/volumen de cloroformo/etanol y se dejó en agitación durante toda la noche. Una vez obtenida la mezcla, se colocaron las diferentes concentraciones de CHX y posteriormente esta se colocó en la cámara de fluido de un aerógrafo, conectado a un tanque de gas de argón con una presión de salida del gas de 25 Psi y se depositaron por un tiempo de 10 minutos. La mezcla polimérica se depositó sobre un sustrato de papel encerado a una distancia de 15 cm. Una vez depositada la mezcla, se dejaron durante 24 horas, con la finalidad de que se volatilice el solvente.

8.7 Caracterización de los andamios

Se realizó la caracterización de los andamios de PLA/CHX obtenidos por medio de la técnica de hilado por propulsión de gas mediante MEB (JEOL JSM-6610LV) para obtener imágenes en alta resolución y lograr analizar la morfología superficial de las fibras y EDS acoplado al mismo equipo para realizar el análisis de composición química elemental. También se realizó la caracterización con FTIR (Vertex 70, Bruker) con el objetivo de identificar las bandas de los componentes moleculares y estructuras del material.

8.8 Cultivo celular

Se utilizó un linaje humano (hFBO), se cultivaron en el laboratorio de Bioingeniería de Tejidos (UNAM). El tubo se centrifugó a 500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1.5 ml de medio, suero fetal bovino y antibióticos (penicilina, estreptomycin). Después se colocó en una caja de cultivo de 6 pozos con 1.5 ml de medio y se mantuvo a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 5% CO₂ en un ambiente de 100% de humedad. El cultivo se dejó colonizar durante 2 semanas para posteriormente sembrar en cajas de 75 cm².

8.9 Ensayo de adhesión celular.

Se utilizó el ensayo de cristal violeta para analizar la interacción de las células hFBO en contacto con los andamios de PLA/CHX.

Se sembraron sobre los andamios a la concentración de 5×10^3 , y se cultivaron en cajas de 96 pozos durante 6 y 24 horas. Transcurrido el tiempo de adhesión celular; las células se lavaron con PBS; se fijaron con PFA durante 30 minutos, se lavaron con PBS y se incubaron en una solución de cristal violeta al 1% por 15 minutos. Se lavó el exceso de cristal violeta con agua bidestilada y se extrajo el colorante con 200 μ l. La solución resultante fue leída en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550nm. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre los andamios de PLA.

8.10 Ensayo de proliferación celular

Para el ensayo de proliferación celular se utilizó el kit WST y de esta manera lograr evaluar la proliferación de los osteoblastos con los andamios sintetizados. El WST permite realizar ensayos de proliferación utilizando la sal de tetrazolio altamente soluble en agua de Dojindo. La sal monosódica de WST [2- (2-metoxi-4-nitrofenil) - 3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disulfofenil) -2H-tetrazolio] produce un colorante de formazán soluble en agua debido a la reducción por la presencia de un portador de electrones. El kit WST no requiere de premezclar componentes, es una solución de una botella, no es radioactivo, permite ensayos colorimétricos sensibles para la determinación de células viables en la proliferación celular y citotoxicidad. La sal WST es reducida por deshidrogenasas dentro de la célula a nivel mitocondrial para dar una coloración amarilla. El producto (formazán) es soluble en el medio de cultivo celular. La cantidad de colorante por formazán o generada debido a la actividad de las deshidrogenasas en las células es directamente proporcional al número de células vivas.

Las células se sembraron en cajas de 96 pozos en contacto con los andamios, en medio normal y se incubaron durante 2, 4, 6, 8 y 12 días. Se realizaron las mediciones en los días correspondientes, en cada medición se colocaron 10 μ l de WST para cada muestra y se dejaron incubando (37°C, 5% CO₂) durante 4 horas para que se lleve a cabo el proceso óxido-reducción y obtener el formazán. Transcurrido el tiempo de incubación se pasaron el medio de cultivo de cada muestra a un microplato de lectura para realizar las mediciones correspondientes en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 550 nm y de esta manera obtener la absorbancia. Después de cada lectura se colocaron 200 μ l nuevamente para la siguiente lectura.

8.11 Esquema de trabajo

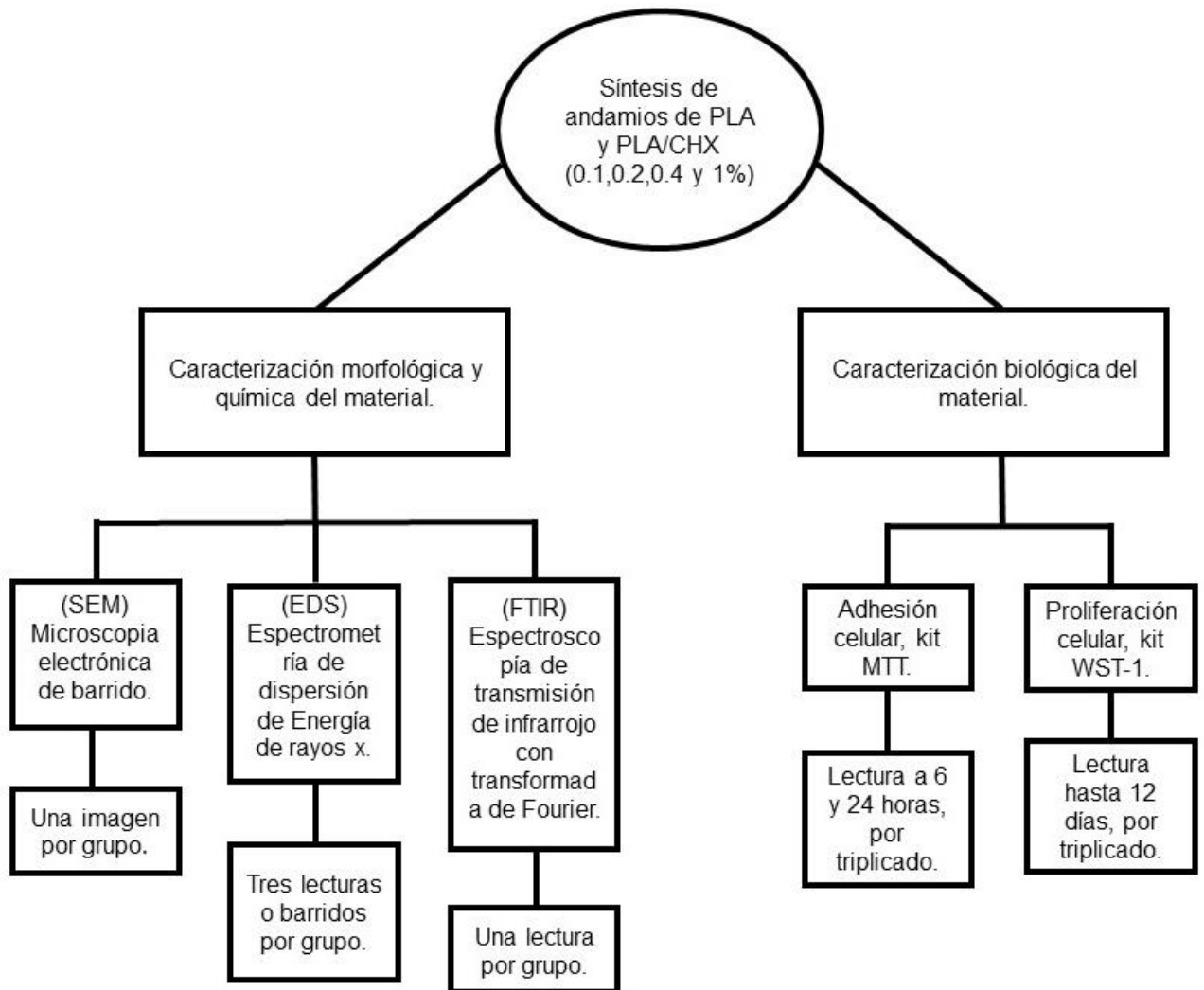


Fig. 6 Procedimiento de la metodología de trabajo.

8.12 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa Graph Pad Prism. Se realizó la prueba estadística ANOVA de dos vías y Tukey Post-Hoc para la comparación entre grupos, representando la significancia \pm desviación estándar. Los resultados fueron considerados significativos con una $p < 0.05$.

8.13 Logística

8.13.1 Recursos Humanos

- Director responsable.
- Director disciplinario.
- Director metodológico.
- Asesor externo
- Alumno responsable.

8.13.2 Recursos Materiales

- PLA Nature Works, Minnetonka, MN, USA.
- Gluconato de Clorhexidina
- Cloroformo
- Acetona
- Medio Dulbeccos modificado (DMEM)
- Tripsina EDTA (0.25%)
- SFB (Suero fetal bovino)
- Etanol 96% v/v
- Agua destilada
- Agua desionizada Milipore
- PBS (Solución buffer de fosfatos)

8.13.3 Recursos Financieros

-CONACyT del proyecto A1-S-9178
-DGAPA-UNAM: proyecto IT203618

8.14 Bioética

NOM- 087-ECOL-SSA1-2002

Tejidos, órganos y partes que se extirpan o remueven durante las necropsias, la cirugía o algún otro tipo de intervención quirúrgica, que no se encuentren en formol. Así como también muestras biológicas para análisis químico, microbiológico, citológico e histológico, excluyendo orina y excremento; cadáveres y partes de animales que fueron inoculados con agentes enteropatógenos en centros de investigación y bioterios.

Eliminación: Se mantienen en bolsas de polietileno y hay una recolección externa para recibir un tratamiento físicos y químicos.

9. RESULTADOS

9.1 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL

9.1.1 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

En los resultados del análisis por MEB de los andamios nanofibrilares de PLA/CHX podemos observar una distribución desordenada de fibras, formando poros interconectados de diferente diámetro en la membrana, con una superficie de contacto adecuada como se muestra en las *figuras 7-11*.

Las imágenes obtenidas por la técnica MEB también fueron utilizadas con fines cuantitativos para realizar el análisis de las distribuciones de diámetros de las fibras. Se realizaron 100 mediciones por imagen, esto para analizar la homogeneidad del diámetro medio de las fibras mediante el software Image J y Origin 8.

En las *figuras 7-11* se muestran las imágenes de MEB de las fibras junto con el gráfico del análisis de su distribución de diámetros, donde se obtuvo un promedio del diámetro de fibra de $0.760 \pm 3.18 \mu\text{m}$, $0.893 \pm 0.353 \mu\text{m}$, $0.842 \pm 0.525 \mu\text{m}$, $0.797 \pm 0.405 \mu\text{m}$ y $1.189 \pm 0.644 \mu\text{m}$ respectivamente para PLA y grupos experimentales PLA/CHX al 0.1%, 0.2%, 0.4% y 1%.

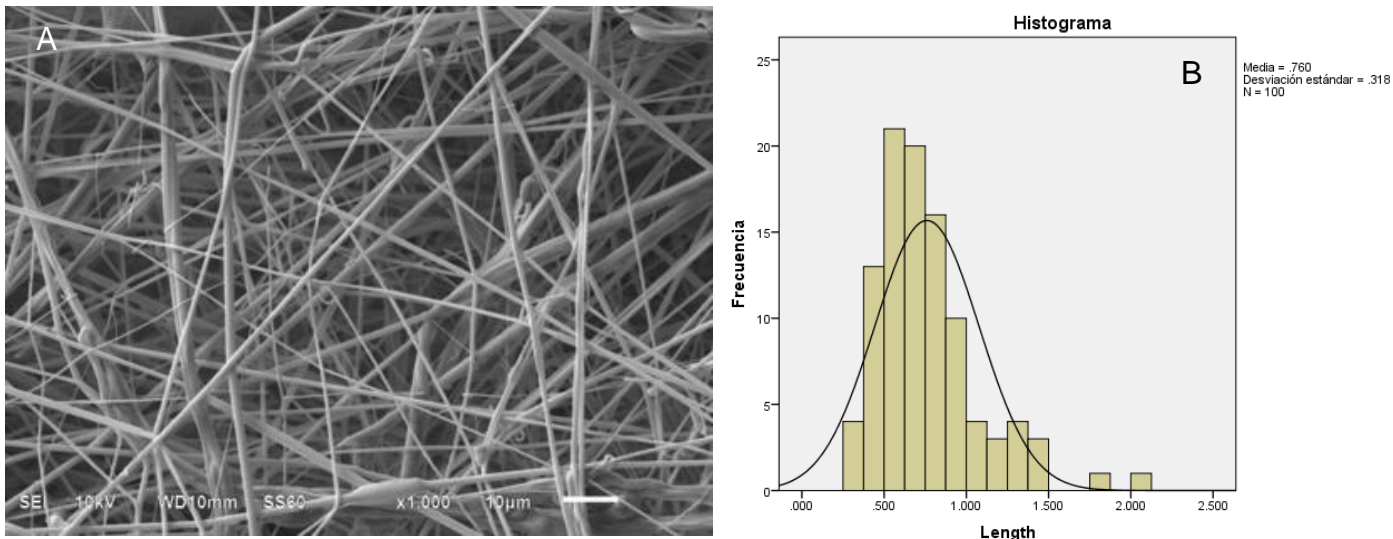


Fig. 7A: Imagen MEB (1000x) membrana PLA 10%; 7B: Distribución de diámetros PLA.

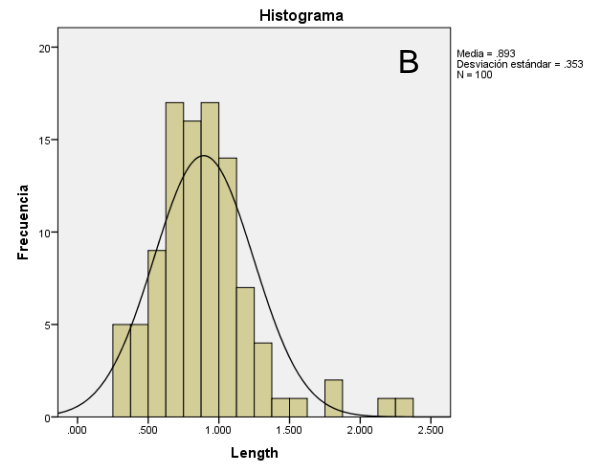
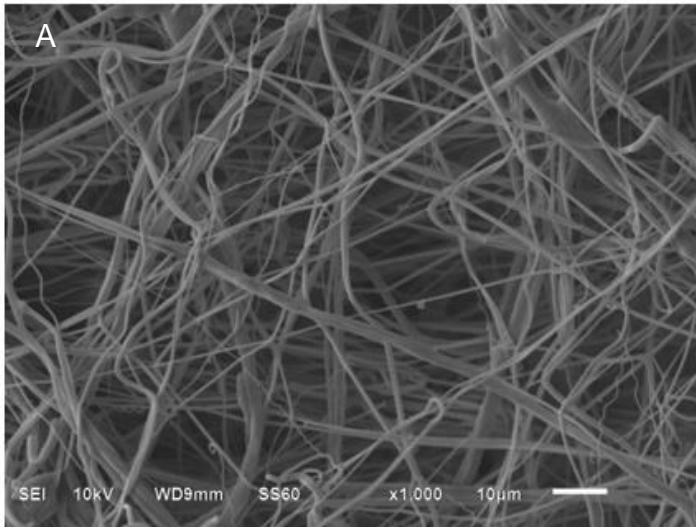


Fig. 8A: Imagen MEB (1000x) membrana PLA 10%/ CHX 0.1%; 8B: Distribución de diámetros membrana PLA 10%/ CHX 0.1%.

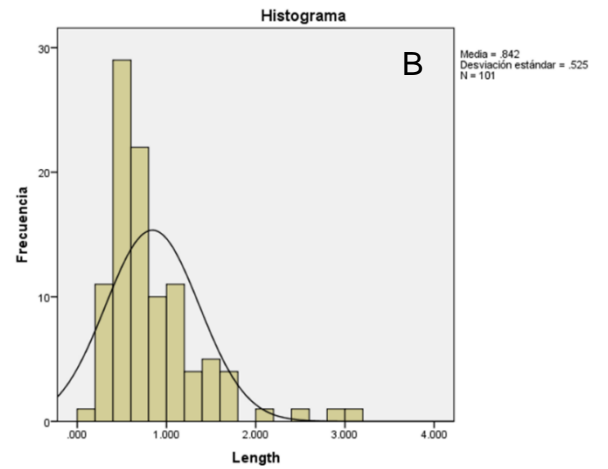
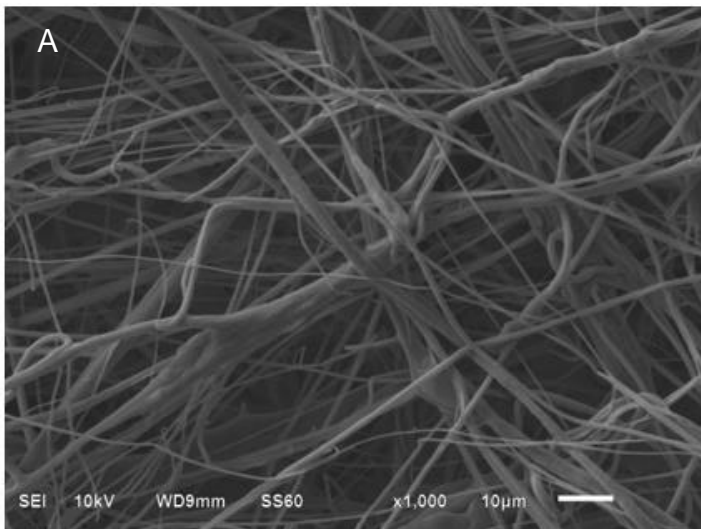


Fig. 9A: Imagen MEB (1000x) membrana PLA 10%/ CHX 0.2% 9B: Distribución de diámetros membrana PLA 10%/ CHX 0.2.

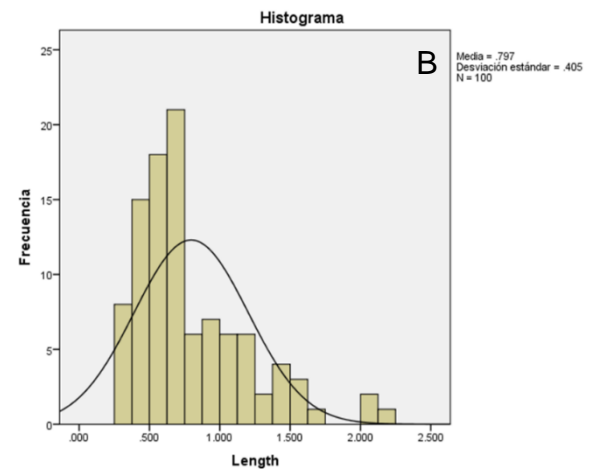
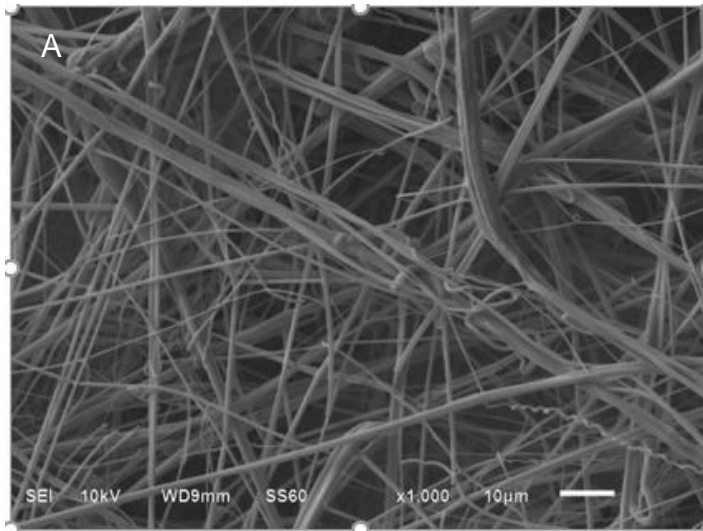


Fig. 10A: Imagen MEB (1000x) membrana PLA 10%/ CHX 0.4%; 10B: Distribución de diámetros membrana PLA 10%/ CHX 0.4%.

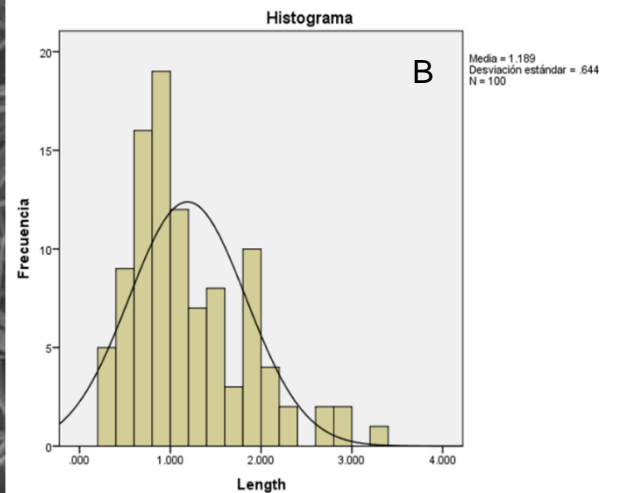
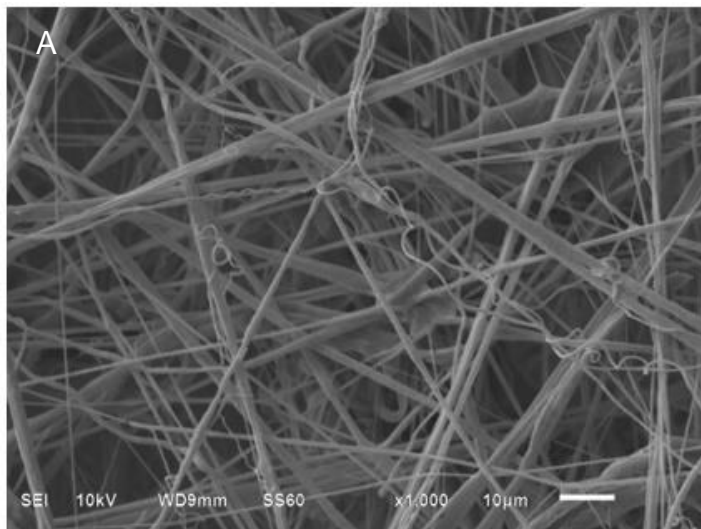


Fig. 11A: Imagen MEB (1000x) membrana PLA 10%/ CHX 1%; 11B: Distribución de diámetros membrana PLA 10%/ CHX 1.

9.1.2 Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)

El análisis de EDS se utilizó para evaluar la composición química de las membranas poliméricas, dentro de los cuales encontramos carbono (C) y oxígeno (O) presentes en el polímero de PLA, sin embargo, en el caso de las membranas cargadas (PLA/CHX) encontramos un pico correspondiente a Cloro (Cl) en diferentes porcentajes atómicos, obteniendo resultados cuantitativos del porcentaje de este observados en las *figuras 17 y 18*.

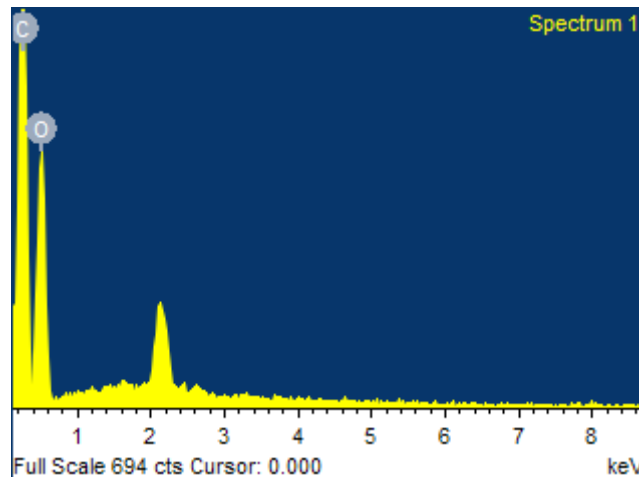


Fig.12 EDS de membrana de PLA 10%

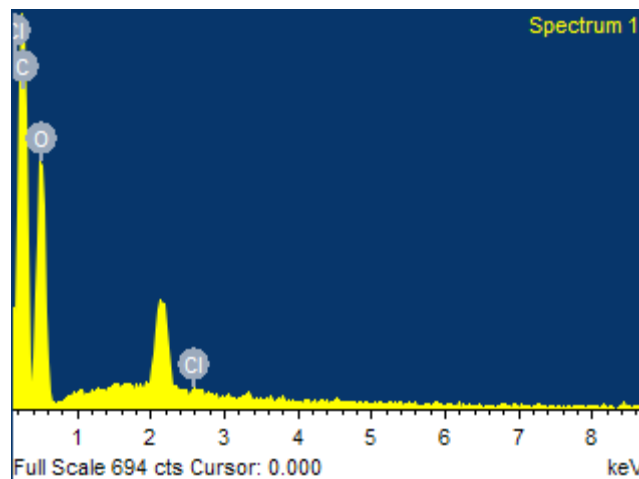


Fig.13 EDS de membrana de PLA 10%/ CHX 0.1 %

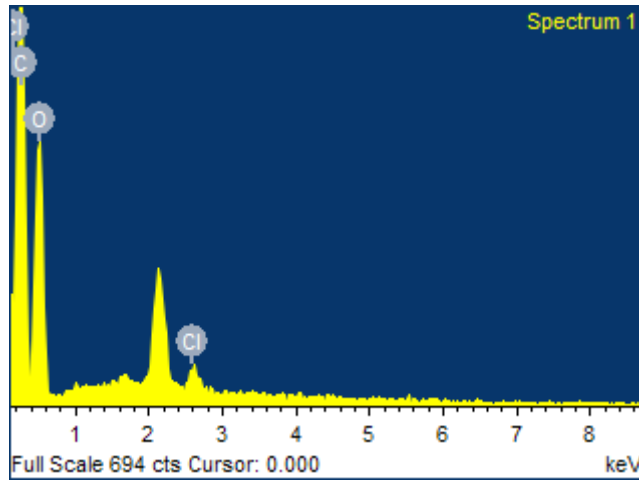


Fig.14 EDS de membrana de PLA 10%/ CHX 0.2%

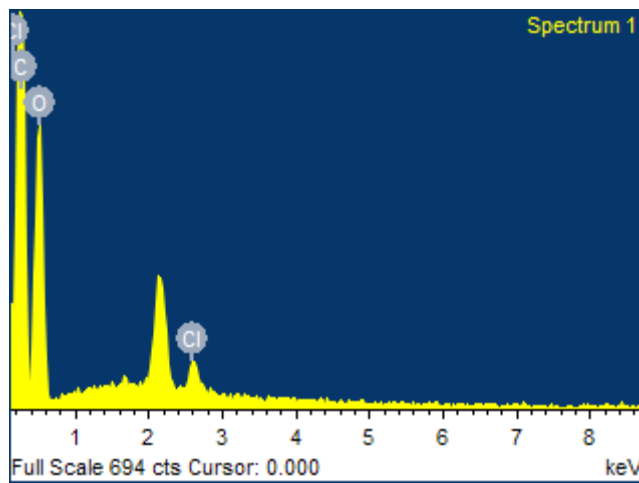


Fig.15 EDS de membrana de PLA 10%/ CHX 0.4 %

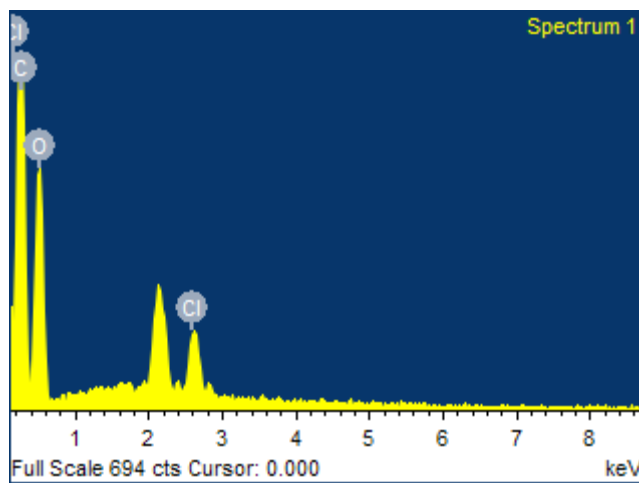


Fig.16 EDS de membrana de PLA 10%/ CHX 1 %

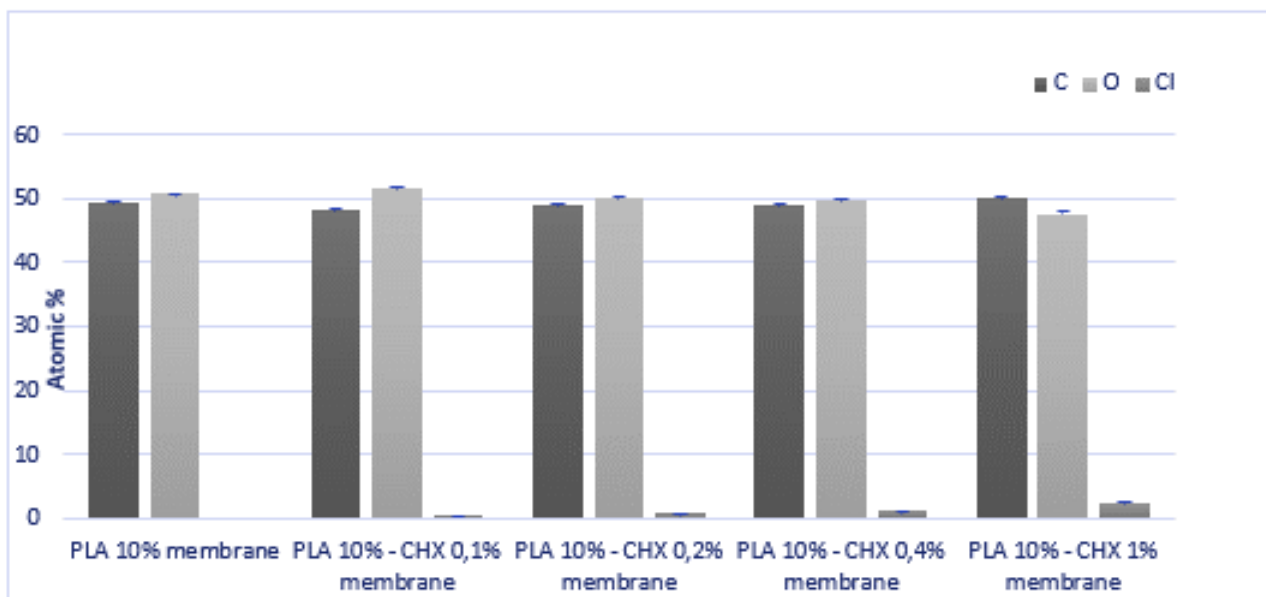


Fig.17 Análisis cuantitativo EDS de porcentaje atómico (C, O y Cl) presentes en membranas de PLA y PLA/ CHX

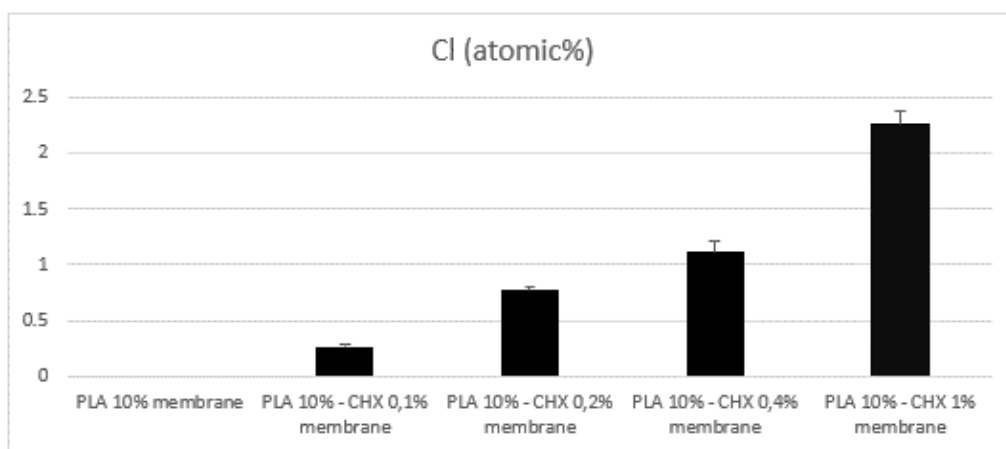


Fig.18 Análisis cuantitativo EDS del porcentaje atómico del Cl presente en grupos experimentales.

9.1.3 Espectroscopia Infrarroja.

Por medio de la técnica de espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) se ha comprobado de manera cualitativa la presencia del biocida CHX en las fibras poliméricas del ácido poli-láctico. En la *figura 19* se muestra el espectro correspondiente del gluconato de clorhexidina.

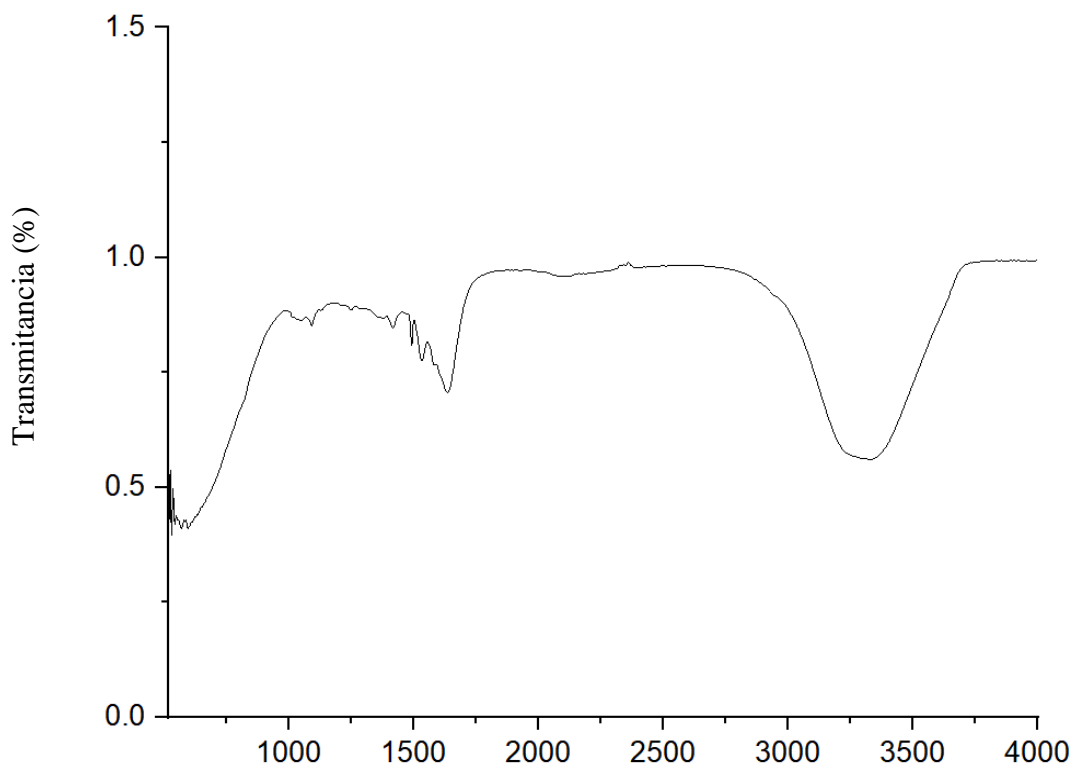


Fig. 19 Espectro FTIR de gluconato de clorhexidina

En la *figura 19*, las flechas indican las distintas bandas que se encuentran entre $1450\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ y corresponden a las aminas que caracterizan la biguanida. Para la CHX se marca una banda a 1493 cm^{-1} que corresponde al *C=N stretching* y a 1535 cm^{-1} que corresponde al enlace N-H que se caracteriza por ser una banda de intensidad fuerte. (61) Estas bandas son usadas para demostrar de forma cualitativa la presencia de las biguanidas en las fibras obtenidas de las mezclas de PLA-CHX, tal como se muestra en la *figura 20*.

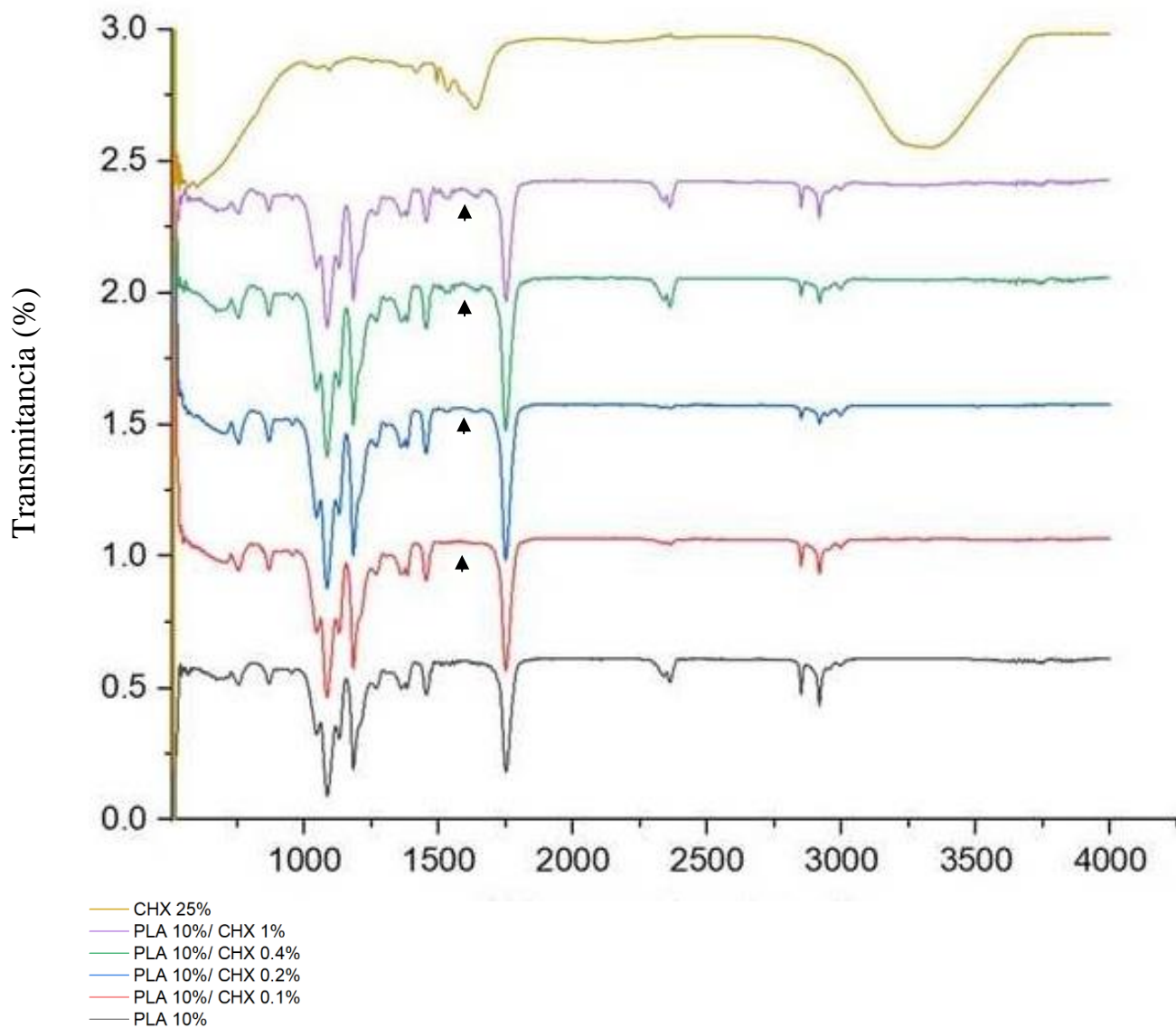


Fig. 20 Espectros correspondientes a las fibras de AJS con y sin carga de CHX.

Se pueden observar la presencia de las bandas más características del PLA: 1747 cm^{-1} –C=O stretching, en 1449 cm^{-1} –CH₃ bending, en 1182 cm^{-1} –C-O-C- vibration y en 1083 cm^{-1} –C-O.(62)

9.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS

9.2.1 Ensayo de adhesión celular

En el ensayo de adhesión celular de los osteoblastos humanos valorados a 6 y 24 horas, se observó que los andamios con mejores resultados fueron los de PLA 10% sin cargar con una significancia de $p < 0.0001$ a las 6 horas en comparación con los andamios cargados con CHX. A las 24 horas observamos un comportamiento similar con una $p < 0.0001$ para los andamios con CHX al 0.2, 0.4 y 1% y una $p < 0.01$ para el andamio con CHX al 0.2% (Figura 21).

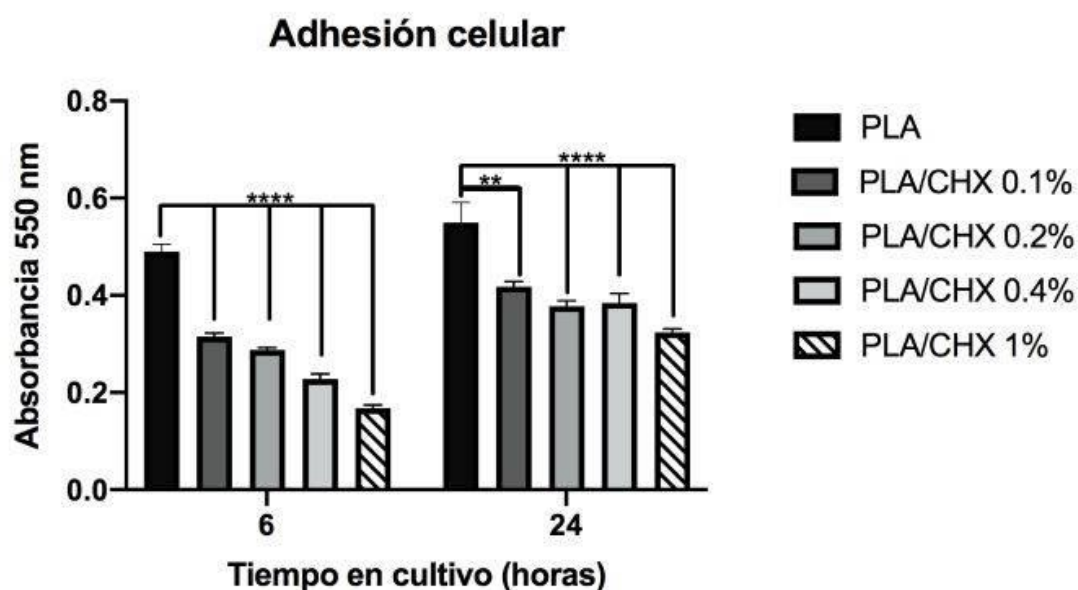


Fig. 21 Adhesión celular de osteoblastos a 6 y 24 horas por el ensayo de cristal violeta (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

9.2.2 Ensayo de proliferación celular

En el ensayo de proliferación celular con osteoblastos fetales humanos se realizó la evaluación a los 2, 4, 6, 8 y 12 días, durante este periodo se observó que todos los andamios cargados con clorhexidina presentaron diferencias significativas a través del tiempo en comparación con el andamio control de PLA 10%. La proliferación en los andamios cargados se observó por debajo durante el periodo evaluado en comparación con los andamios de PLA con una significancia * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ en los diferentes tiempos (Figura 22).

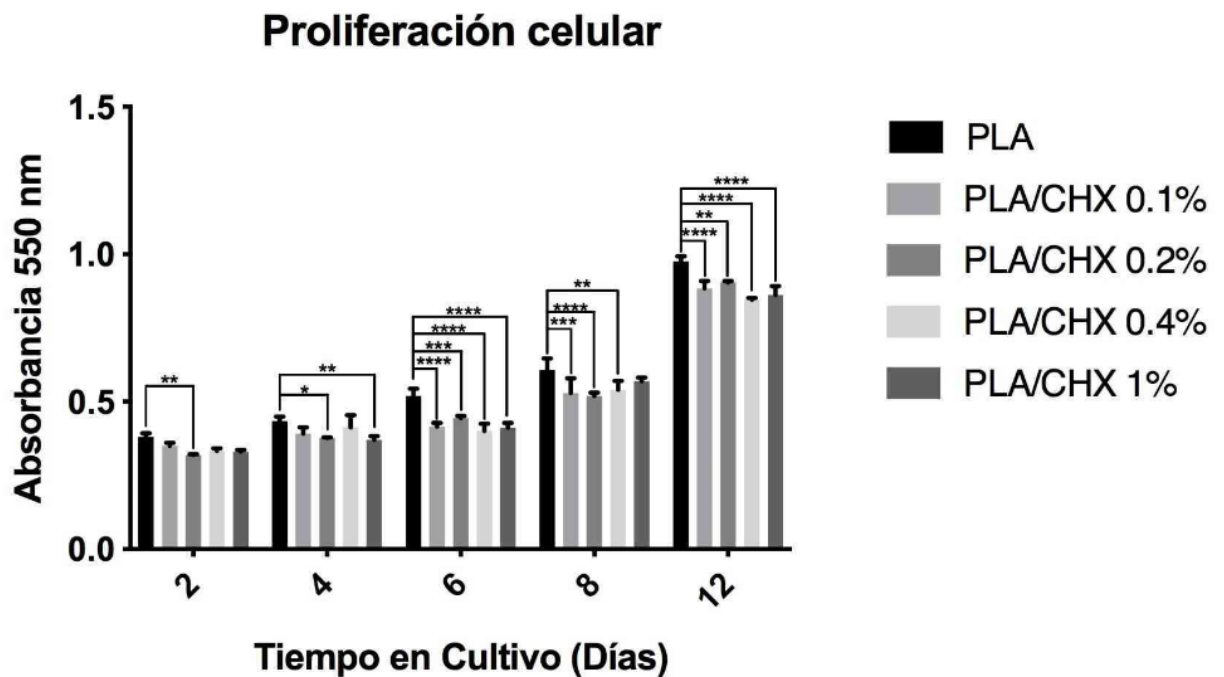


Fig. 22 Proliferación celular de osteoblastos a 2, 4, 6, 8 y 12 días por el ensayo de WST-1 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

10. DISCUSION

El presente estudio tuvo como objetivo el sintetizar y caracterizar membranas cargadas con digluconato de CHX enfocado a la regeneración tisular y ósea periodontal, disminuyendo la carga bacteriana durante estos procesos. Confiriéndole una estructura que permita el crecimiento celular. Las membranas de mayor uso en la clínica y con una mejor aceptación por parte del paciente hoy en día son las membranas reabsorbibles, debido a las ventajas con las que cuenta, dentro de las más importantes, evitar una segunda cirugía para el retiro de la estructura, por lo general de titanio, como es el caso de las membranas no reabsorbibles.

Debido a esto se siguen desarrollando y estudiando nuevos biomateriales para mejorar la función de los que tienen mayor comercialización. El uso del PLA en la ingeniería de tejidos es de los más estudiados y prometedores con aplicaciones biomédicas, siendo uno de los pocos polímeros sintéticos aprobados por la FDA con aplicaciones clínicas en humanos. Por lo que en este estudio fue utilizado como matriz de la membrana, ya que sus buenas propiedades (excelente biocompatibilidad, fuerza mecánica, procesabilidad y solubilidad en solventes orgánicos) aunado con el tiempo de biodegradación que presenta (6 meses por procesos enzimático) permiten cumplir la función de acuerdo con el tiempo clínico que se requiere. Las características con las que cuenta el PLA han permitido que en estudios previos se ha utilizado como un sistema de liberación sostenido. En base a esto incorporamos la CHX con el propósito de obtener una membrana con liberación sostenida del antiséptico y de esta manera disminuir la complicación frecuente de una colocación de bacterias por una exposición de membrana (63).

Las bacterias asociadas a la enfermedad periodontal pueden interferir con la regeneración de los tejidos posterior a la regeneración tisular guiada. Estudios in vitro muestran un gran número de adhesión de bacterias significativamente mayor en membranas reabsorbibles de colágeno en comparación con las no reabsorbibles (PTFE). Como método de prevención y disminución de la carga bacteriana, soluciones de digluconato de CHX son usualmente prescritos postquirúrgicamente.

Se logró sintetizar andamios membranosos mediante la disolución del PLA y la mezcla de PLA-CHX. Fue utilizada la técnica de hilado por propulsión de gas, en todos los casos con un porcentaje polimérico del 10 %, reportada por Suarez y cols. (57) con algunas modificaciones para lograr la incorporación de la CHX, ya que dicho porcentaje polimérico mejora la geometría, morfología y tipografía de las fibras, así como la mecánica del andamio, con una adecuada distribución aleatoria. Se realizaron variaciones dentro de la concentración de la CHX a cargar. Los porcentajes más comunes de este fármaco para uso odontológico es del 0.12% y 2%, con una toxicidad baja a nivel tisular, por lo que se decidió estudiar 4 porcentajes diferentes (0.1, 0.2, 0.4 y 1%).

Estudios previos han evaluado el nivel de viabilidad celular de diferentes soluciones antisépticas comúnmente utilizadas durante una infección local en la cavidad oral y

en la región maxilofacial, iodopovidona 0.5%, digluconato de CHX 0.2%, peróxido de hidrógeno 1% e hipoclorito de sodio 0.25%. Encontrando en todos los antisépticos experimentales, que a mayor exposición se promueve mayor muerte celular. El hipoclorito de sodio mostró significativamente mayor muerte celular en todos los tiempos evaluados. Y la viabilidad celular ósea fue mayor en el grupo de la clorhexidina favoreciendo los factores de crecimiento celular (64–66).

Se ha reportado que el porcentaje máximo de CHX para poder incorporarlo a fibras es de 0.5%(67), por lo que en este estudio se utilizaron en su mayoría porcentajes por debajo a este. También se ha reportado que la concentración al 0.002% es la única que no interfiere con la proliferación a nivel celular de fibroblastos gingivales, osteoblastos y miofiblastos (66) (68).

En la terapia clínica periodontal, se ha demostrado que el uso de andamios membranosos es viable. Para algunos tratamientos los andamios deben de contar con ciertos requisitos, como lo es una específica arquitectura geométrica similar al microambiente de la MEC periodontal. Los andamios nanofibrilares están cercanos a imitar esta estructura superficial y morfología de la MEC nativa de muchos tejidos.

En las imágenes de las superficies de los andamios obtenidos (Fig. 7-11) se logra observar fibras aleatorias interconectadas con una porosidad y superficie de contacto adecuado. Su estructura fibrilar nanométrica permite una función deseable en cuanto a la célula y el microambiente con respecto a la MEC.

Al igual el andamio es más biocompatible y efectivo cuando la morfología de este es similar o logra asemejarse a la estructura del tejido nativo (MEC), lo cual logramos cuidando la química y parámetros del material elaborado. Esta similitud estructural se logró observar mediante la caracterización del Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) ya que obtuvimos una arquitectura tridimensional con una morfología homogénea, permeabilidad fluida, poros interconectados por fibras con un tamaño que oscilan entre 760 nm y 1189 nm y que cuentan con buena superficie de contacto entre ellos lo cual nos confiere ventajas para que el material se degrade y cambie por el tejido de reparación deseado conforme al tiempo, y de la misma manera la célula logre adherirse, proliferar y diferenciarse.

Dependiendo de la aplicación será el tipo de biomolécula o agente bioactivo con el que se cargará el andamio ya que primero se necesita entender el mecanismo molecular o señalizaciones deseadas específicas para poder manipular la función terapéutica del material, con el objetivo de obtener un andamio inteligente e imitar en gran parte la morfología y función del tejido natural. En este caso se incluyó un fármaco antiséptico que permitiera la regeneración tisular y ósea y se evaluó la estabilidad química y morfológica del material, así como el comportamiento a nivel celular

En el análisis de las distribuciones de diámetro fibrilar se observó un ligero incremento de diámetro correspondiente al incremento en la concentración de 1% CHX, pero sin alterar la distribución ni morfología superficial de la membrana. El tamaño de fibra nanométrico en los andamios de PLA que se sintetizaron en este

estudio fue similar al utilizando en otros ya reportados (57), con un porcentaje del 10%, por lo que la técnica desarrollada fue procesada correctamente

En el análisis cualitativo y cuantitativo del porcentaje atómico del EDS se observa un incremento en la presencia de Cloro (Cl), perteneciente a la CHX, con respecto a la concentración utilizada para cada grupo experimental.

En la caracterización química de la estructura de los andamios de PLA, por medio de la espectrometría de FTIR se demostró que posterior a la inclusión del fármaco dentro de la síntesis, el polímero no sufrió ningún cambio en su composición observando los grupos amida característicos.

De manera cualitativa dentro de la espectrometría FTIR también se observan las bandas de la transmitancia en la *figura 20*, correspondientes al grupo biguanida pertenecientes a la CHX, observadas en un rango de 1450-1550 cm^{-1} e incrementando de la misma forma (61) en proporción a la concentración de síntesis para cada andamio.

En los ensayos biológicos *in vitro* se observó una adhesión y proliferación disminuida significativa de los hFBO en contacto con las membranas cargadas con CHX, en comparación con el grupo control de PLA, esto puede deberse a que la cantidad de CHX liberada en el medio de cultivo durante los ensayos estuvo por encima del porcentaje máximo tolerado (0.002%) para las células osteoblásticas, esto hasta los 12 días.

Pruebas futuras deben ser realizadas, para evaluar la citotoxicidad de los andamios evaluados en este estudio (0.1, 0.2, 0.4 y 1%) a un nivel tisular *in vivo*, ya que la CHX es usada normalmente en concentraciones entre 0.12% y 2% en odontología (44)(69). A estas concentraciones tiene un nivel de toxicidad tisular extremadamente bajo, tanto local como sistémicamente y sin una aparente toxicidad a los tejidos gingivales.

11. CONCLUSIONES

La composición química de la síntesis permitió la incorporación de la CHX en la matriz de PLA con la técnica de hilado por propulsión de gas y fue optimizada correctamente produciendo matrices nanofibrilares cargadas.

El análisis de microscopía MEB nos indicó que el diámetro que se genera por las fibras está en rangos nanométricos y permite obtener arquitecturas porosas y de superficie en rangos de nanómetros y micrómetros para un desarrollo celular adecuado.

La caracterización de EDS y FTIR demostraron la presencia de CHX en la composición de las fibras. No se observaron posibles interacciones entre la CHX y el PLA, por lo que se infiere un ordenamiento de la CHX en la matriz.

La cantidad de CHX liberada de los andamios en los ensayos biológicos fue mayor a la tolerada por las células hFOB disminuyendo significativamente el crecimiento a los 12 días evaluados.

Dentro de las perspectivas del estudio se propone la evaluación de los andamios sintetizados en algún modelo animal. Con previa evaluación de la cinética de liberación de la CHX, para analizar el mecanismo difusión, y pruebas bacterianas para evaluar halos de inhibición.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Daristotle JL, Behrens AM, Sandler AD, Ko P. A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(51):34951–63.
2. Reddy MS, Jeffcoat MK, Geurs NC, Palcanis KG, Weatherford TW, Traxler BM, et al. Efficacy of Controlled-Release Subgingival Chlorhexidine to Enhance Periodontal Regeneration. *J Periodontol [Internet]*. 2003;74(4):411–9.
3. Yen-Ting Chen, Shan-Ling Hung, Li-Wen Lin, Lin-Yang Chi L JL. Attachment of Periodontal Ligament Cells to Chlorhexidine-Loaded Guided Tissue Regeneration Membranes. *J Periodontol*. 2003;74(11):1652–9.
4. Tal H, Moses O, Kozlovsky A, Nemcovsky C. Bioresorbable Collagen Membranes for Guided Bone Regeneration. *Bone Regen*. 2012;111–38.
5. Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu TMG, Kowolik MJ, et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration - A materials perspective. *Dent Mater [Internet]*. 2012;28(7):703–21.
6. Perez RA, Lee HH, Kim HW, Park CH, Kim JH, Shi S, et al. Advanced Biomatrix Designs for Regenerative Therapy of Periodontal Tissues. *J Dent Res*. 2014;93(12):1203–11.
7. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nature*. 2018;3:159–74.
8. G. Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, S. Kornman K, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018;45(March):S1–8.
9. Goldman HM, Cohen DW. The Infrabony Pocket: Classification and Treatment. *J Periodontol*. 1958;29(4):272–91.
10. Tarnow D, Fletcher P. Classification of the Vertical Component of Furcation Involvement. *J Periodontol*. 2012;55(5):283–4.
11. Sven Erik Hamp, Sture Nyman JL. Periodontal treatment of multirooted teeth. *J Clin Periodontol*. 1975;2:126–35.
12. Siaili M, Chatzopoulou D, Gillam DG. An overview of periodontal regenerative procedures for the general dental practitioner. *Saudi Dent J [Internet]*.

2018;30(1):26–37.

13. Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol*. 2004;12(3–4):367–77.
14. Sreejit P, Verma RS. Natural ECM as Biomaterial for Scaffold Based Cardiac Regeneration Using Adult Bone Marrow Derived Stem Cells. *Stem Cell Rev Reports*. 2013;9(2):158–71.
15. Maeda N. Proteoglycans and neuronal migration in the cerebral cortex during development and disease. *Front Neurosci*. 2015;9(MAR):1–15.
16. Kayabolen A, Keskin D, Aykan A, Karslıoglu Y, Zor F, Tezcaner A. Native extracellular matrix/fibroin hydrogels for adipose tissue engineering with enhanced vascularization. *Biomed Mater*. 2017;12(3).
17. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*. 2003;24(24):4385–415.
18. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J Control Release*. 2013;166(2):182–94.
19. Kohane DS, Langer R. Biocompatibility and drug delivery systems. *Chem Sci*. 2010;1(4):441–6.
20. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*. 2008;20(2):86–100.
21. Anderson JM. Biological Responses to Materials. *Annu Rev Mater Res*. 2001;31:81–110.
22. Bokhari MA, Akay G, Zhang S, Birch MA. The enhancement of osteoblast growth and differentiation in vitro on a peptide hydrogel - PolyHIPE polymer hybrid material. *Biomaterials*. 2005;26(25):5198–208.
23. Kopeček J. Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials*. 2007;28(34):5185–92.
24. Yang KC, Wu CC, Cheng YH, Kuo TF, Lin FH. Chitosan/Gelatin Hydrogel Prolonged the Function of Insulinoma/Agarose Microspheres In Vivo During Xenogenic Transplantation. *Transplant Proc [Internet]*. 2008;40(10):3623–6.
25. Antonios G, Mikos JST. Formation of Porous Biodegradable Scaffolds for Tissue Engineering. *Electron J Biotechnol*. 2002;19(2):140–4.
26. Granados M V, Montesinos JJ, Álvarez Pérez MA. Adhesión y proliferación de las células troncales mesenquimales de médula ósea en andamios fibrilares

- de poli (ácido L-láctico) (PLA). *Rev Mex Ing Biomédica*. 2017;38(1):288–96.
27. Langer R, Vacanti JP. *Tissue Engineering*. Science (80-). 1993;260:920–6.
 28. Yunus Basha R, Sampath SK, Doble M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2015;57:452–63.
 29. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials*. 2003;24(24):4337–51.
 30. Seyednejad H, Gawlitta D, Dhert WJA, Van Nostrum CF, Vermonden T, Hennink WE. Preparation and characterization of a three-dimensional printed scaffold based on a functionalized polyester for bone tissue engineering applications. *Acta Biomater* [Internet]. 2011;7(5):1999–2006.
 31. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008;29(20):2941–53.
 32. Slaughter B V., Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater*. 2009;21(32–33):3307–29.
 33. Valiente AR, Gómez TS. Elaboración de un protocolo para el manejo de la herida quirúrgica en cirugía de cabeza y cuello. Una cura eficaz, efectiva y eficiente en pacientes laringectomizados. *Gerokomos*. 2014;25(2):81–9.
 34. Boateng J, Catanzano O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing - A Review. *J Pharm Sci*. 2015;104(11):3653–80.
 35. Holpuch AS, Desai K-GH, Schwendeman SP, Mallery SR. Optimizing therapeutic efficacy of chemopreventive agents: A critical review of delivery strategies in oral cancer chemoprevention clinical trials. *J Carcinog*. 2011;10:23.
 36. Piatkowski A, Drummer N, Andriessen A, Ulrich D, Pallua N. Randomized controlled single center study comparing a polyhexanide containing bio-cellulose dressing with silver sulfadiazine cream in partial-thickness dermal burns. *Burns*. 2011;37(5):799–803.
 37. Wishart Research Group. DrugBank: Chlorhexidine. DB00878. 2016.
 38. Umscheid C a. Systematic Review and Cost Analysis comparing use of Chlorhexidine with use of Iodine for preoperative skin antiseptics to prevent surgical site infection. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013;31(12):1219–29.
 39. Genuit T, Bochicchio G, Napolitano LM, McCarter RJ, Roghman MC. Prophylactic chlorhexidine oral rinse decreases ventilator-associated pneumonia in surgical ICU patients. *Surg Infect (Larchmt)*. 2001;2(1):5–18.

40. Goldenberg RL, McClure EM, Saleem S, Rouse D, Vermund S. Use of vaginally administered chlorhexidine during labor to improve pregnancy outcomes. *Obstet Gynecol.* 2006 May;107(5):1139–46.
41. Huang H-P, Chen B, Wang H-Y, He M. The efficacy of daily chlorhexidine bathing for preventing healthcare-associated infections in adult intensive care units. *Korean J Intern Med.* 2016 Apr;31(6):1159–70.
42. Zorko M, Jerala R. Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Oct;62(4):730–7.
43. Edmiston CE, Okoli O, Graham MB, Sinski S, Seabrook GR. Evidence for Using Chlorhexidine Gluconate Preoperative Cleansing to Reduce the Risk of Surgical Site Infection. *AORN J.* 2010;92(5):509–18.
44. Conference TE, Douglas P. Chlorhexidine Gluconate This article is based on a presentation to the Fourth. *Aust Endod J.* 2004;31(2):48–52.
45. Lim KS, Kam PCA. Chlorhexidine - Pharmacology and clinical applications. *Anaesth Intensive Care.* 2008;36(4):502–12.
46. National Center for Biotechnology Information N. PubChem Compound Database; CID 9552079, Chlorhexidine. 2016.
47. Li LY, Cui LY, Zeng RC, Li SQ, Chen XB, Zheng Y, et al. Advances in functionalized polymer coatings on biodegradable magnesium alloys – A review. *Acta Biomater [Internet].* 2018;79(August):23–36.
48. Santoro M, Shah SR, Walker JL, Mikos AG. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;107:206–12.
49. Gupta B, Revagade N. Poly (lactic acid) fiber : An overview. *Prog Polym Sci.* 2007;32(4):455–82.
50. Luo D, Zhang X, Shahid S, Cattell MJ, Gould DJ, Sukhorukov GB. Electrospun poly(lactic acid) fibers containing novel chlorhexidine particles with sustained antibacterial activity. *Biomater Sci.* 2017;5(1):111–9.
51. Sinha-Ray S, Sinha-Ray S, Yarin AL, Pourdeyhimi B. Theoretical and experimental investigation of physical mechanisms responsible for polymer nanofiber formation in solution blowing. *Polymer (Guildf) [Internet].* 2015;56:452–62.
52. Shao D, Wei Q. Microwave-assisted rapid preparation of nano-ZnO/Ag composite functionalized polyester nonwoven membrane for improving its UV shielding and antibacterial properties. *Materials (Basel).* 2018;11(8).

53. Hanke L. Handbook of analytical methods for materials. Mater Eval Eng Inc. 2001;1–50.
54. Inkson BJ. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization [Internet]. Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods. Elsevier Ltd; 2016. 17–43 p.
55. Da Silva Parize DD, De Oliveira JE, Foschini MM, Marconcini JM, Mattoso LHC. Poly(lactic acid) fibers obtained by solution blow spinning: Effect of a greener solvent on the fiber diameter. *J Appl Polym Sci*. 2016;133(18):1–10.
56. Granados-Hernández MV, Serrano-Bello J, Montesinos JJ, Alvarez-Gayosso C, Medina-Velázquez LA, Alvarez-Fregoso O, et al. In vitro and in vivo biological characterization of poly(lactic acid) fiber scaffolds synthesized by air jet spinning. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2018;106(6):2435–46.
57. Suárez- Franco JL, Vázquez-Vázquez FC, Pozos-Gullén A, Montesinos JJ, Álvarez-Fregoso O, Álvarez-Pérez MA. Influence of diameter of fiber membrane scaffolds on the biocompatibility of hPDL mesenchymal stromal cells. *Dent Mater J*. 2018;37(3):465–73.
58. Chen L, Bromberg L, Hatton TA, Rutledge GC. Electrospun cellulose acetate fibers containing chlorhexidine as a bactericide. *Polymer (Guildf)*. 2008;49:1266–75.
59. Nan Y, Kai L, Chang M, Cheng S, Yu P, Ray L, et al. Study of release speeds and bacteria inhibiting capabilities of drug delivery membranes fabricated via electrospinning by observing bacteria growth curves. 2011;571–7.
60. Llorens E, Calderón S, Del Valle LJ, Puiggali J. Polybiguanide (PHMB) loaded in PLA scaffolds displaying high hydrophobic, biocompatibility and antibacterial properties. *Mater Sci Eng C*. 2015;50:74–84.
61. Hiraishi N, Yiu CKY, King NM, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine release and water sorption characteristics of chlorhexidine-incorporated hydrophobic/hydrophilic resins. *Dent Mater*. 2008;24(10):1391–9.
62. Vyavahare O, Ng D, Hsu SL. Analysis of structural rearrangements of poly(lactic acid) in the presence of water. *J Phys Chem B*. 2014;118(15):4185–93.
63. Singhvi MS, Zinjarde SS, Gokhale D V. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *J Appl Microbiol*. 2019;127(6):1612–26.
64. Sawada K, Nakahara K, Haga-Tsujimura M, Fujioka-Kobayashi M, Iizuka T, Miron RJ. Effect of Irrigation Time of Antiseptic Solutions on Bone Cell Viability

and Growth Factor Release. *J Craniofac Surg*. 2018;29(2):376–81.

65. Sawada K, Fujioka-Kobayashi M, Kobayashi E, Schaller B, Miron RJ. Effects of Antiseptic Solutions Commonly Used in Dentistry on Bone Viability, Bone Morphology, and Release of Growth Factors. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2016;74(2):247–54.
66. Liu JX, Werner J, Kirsch T, Zuckerman JD, Virk MS. Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts. *J Bone Jt Infect*. 2018;3(4):165–72.
67. Del Valle LJ, Roa M, Díaz A, Casas MT, Puiggalí J, Rodríguez-Galán A. Electrospun nanofibers of a degradable poly(ester amide). Scaffolds loaded with antimicrobial agents. *J Polym Res*. 2012;19(2).
68. Wyganowska-Swiatkowska M, Kotwicka M, Urbaniak P, Nowak A, Skrzypczak-Jankun E, Jankun J. Clinical implications of the growth-suppressive effects of chlorhexidine at low and high concentrations on human gingival fibroblasts and changes in morphology. *Int J Mol Med*. 2016;37(6):1594–600.
69. Rudolf JL, Moser C, Sculean A, Eick S. In-vitro antibiofilm activity of chlorhexidine digluconate on polylactide-based and collagen-based membranes. *BMC Oral Health*. 2019;19(1):1–11.