



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,**  
**ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**“OBTENCIÓN DE ANDAMIOS POR  
ELECTROHILADO DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO) Y  
COLÁGENA DE DENTINA DE BOVINO”**

**T E S I S**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS BÁSICAS  
**P R E S E N T A**

**C.D. AURORA NAVARRO CERÓN**

TUTORES:

Dr. Federico H. Barceló Santana.  
División de Estudios de Posgrado e Investigación  
Facultad de Odontología

Dr. Alfredo Maciel Cerda.  
Instituto de Investigaciones en Materiales

México D.F. Agosto del 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Investigaciones en Materiales y a la División de Estudios de Posgrado e Investigación Facultad de Odontología, por brindarme la oportunidad de mi superación académica y por sus instalaciones brindadas para realizar este trabajo de investigación.

A CONACyT por el apoyo económico impartido durante la maestría.

Al Dr. Alfredo Maciel Cerda y al Dr. Federico H. Barceló Santana por sus conocimientos, consejos que me brindaron, por su paciencia, amistad y el tiempo que me dedicaron para realizar este trabajo de investigación.

Al Dr. Ricardo Vera Graziano por su apoyo e integrarme a su grupo de investigación.

A los Doctores y alumnos que forman parte del grupo de investigación de Nanofibras para la Ingeniería de Tejidos, por su tiempo e ideas en el trabajo diario de laboratorio.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez, Dr. Gabriel Sáez, Dra. Laura Acosta y el Dr. Jesús Arenas, por ser parte del jurado de examen de grado.

Al Q. Miguel Canseco por la caracterización de mis muestras en el equipo de FTIR.

Al Dr. Omar Novelo Peralta y a la Dra. Guillermina González Mancera por la sesiones de microscopía electrónica de barrido.

A la Q.F.B. Damaris Cabrero Palomino por sus estudios de análisis térmicos.

Al Ing. Ernesto Sánchez Colín por las pruebas mecánicas en tensión.

Al Dr. Filiberto Rivera Torres y a la Q. F. B. Maricela Bermúdez Hernández por la contribución en la prueba en ángulo de contacto.

## AGRADECIMIENTOS

A las Doctoras Gloria Gutiérrez Venegas y Diana Barrera por brindarme sus instalaciones de sus laboratorios.

A la Mtra. Alida Ospina, a los Q. Rodolfo y Selene Alcántara. A las Ing. Biomédicas Marisol Garnica y Lizeth Ávila por su apoyo.

A Cristina Hernández Bermúdez y Mónica Villeda Navarro por su ayuda y amistad.

A los Doctores y compañeros del laboratorio de Biomateriales Dentales FOUNAM.

Al Fondo Sectorial CONACYT-Secretaría de Energía-Hidrocarburos (SENER HIDROCARBUROS-117373).

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-IN108913).

A COMECyT por la beca Tesis de Maestría brindada.

A Dr. Elba Leyva Rosa Huerta y las Secretarías Ana María y Laura, por su apoyo durante la estancia en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

## DEDICATORIA

A mi esposo Carlos Mitre Caballero por su compañía, su paciencia y su incondicional ayuda que me ha brindado para culminar unas de mis metas.

A mis padres: Eulogio Navarro y Ma. Trinidad Cerón por sus esfuerzos para mi formación, por su confianza y el amor que me han brindado para terminar estos estudios.

A mis grandes hermanas y al mismo tiempo amigas: Elizabeth, Gisela, Cristina y Jacqueline Navarro, por su apoyo, su cariño y por todas las alegrías y obstáculos que hemos superado juntas.

A Carlos Mitre y Guadalupe Caballero que contribuyeron de alguna forma para realizar este logro.

A todos aquellos amigos de laboratorio que en algún momento compartimos nuestras

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>I</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO I: FUNDAMENTO TEÓRICO .....</b>	<b>6</b>
Ingeniería de Tejidos.....	6
Células en la Ingeniería de Tejidos.....	8
Células en la Regeneración Dental .....	9
Andamios.....	10
Biomoléculas para la Ingeniería de Tejidos. ....	11
Biorreactores .....	12
Matriz Extracelular (MEC) .....	12
Dentina de Humano .....	13
Dentina de Bovino.....	15
Colágena.....	17
Biosíntesis de la Colágena .....	18
Poli(ácido láctico).....	21
Ácido Láctico .....	22
Lactida .....	23
Síntesis de Poli(ácido láctico).....	24

Propiedades del Poli(ácido láctico) .....	25
Degradación del Poli(ácido láctico).....	26
El Poli(ácido-láctico) en la Ingeniería de Tejidos .....	27
Electrohilado .....	29
<b>CAPÍTULO II: TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....</b>	<b>32</b>
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	32
Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X.....	33
Espectroscopia Infrarroja .....	35
<b>CAPÍTULO III: DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>38</b>
Planteamiento del Problema .....	38
Justificación .....	38
Objetivos .....	40
Objetivo General.....	40
Objetivos Específicos.....	40
<b>CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
Materiales y Reactivos .....	41
Para la Obtención de Colágena de Dentina de Bovino (CoD) .....	41
Para Elaborar Andamios Electrohilados de PLA con CoD.....	41
Desarrollo Experimental.....	42
Método para Obtener Colágena de Dentina de Bovino .....	42
Método para Obtener Andamios Electrohilados de PLA y PLA: CoD .....	45
Técnicas de Caracterización de CoD.....	48
Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier .....	48
Microscopía Electrónica de Barrido .....	48
Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS).....	48

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) .....	49
Análisis Termogravimétrico (TGA) .....	49
Técnicas de Caracterización de los Andamios de PLA y PLA: CoD .....	50
Microscopía Electrónica de Barrido .....	50
Ensayo en Tensión .....	51
Ángulo de Contacto .....	51
<b>CAPÍTULO V: RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
Caracterización de la Dentina de Bovino .....	53
Obtención de CoD.....	56
Resultados de la Caracterización de la CoD.....	56
Espectroscopia Infrarroja .....	56
Microscopía Electrónica de Barrido .....	59
Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS).....	61
Análisis Termogravimétrico (TGA).....	62
Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) .....	64
Andamios Electrohilados de PLA y PLA: CoD .....	66
Andamios Electrohilados de PLA y PLA:CoD al 13% .....	66
Andamios Electrohilados de PLA:CoD al 16%.....	72
Caracterización de los Andamios Electrohilados con los parámetros finales de PLA y PLA: CoD .....	84
Porcentaje de Área Porosa.....	84
Propiedades Mecánicas.....	85
Ángulo de Contacto .....	88
<b>CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>91</b>
Discusión .....	91



Conclusiones .....	98
Perspectiva .....	100
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>101</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la ingeniería de tejidos.....	7
<b>Figura 2.</b> Estructura dental. ....	14
<b>Figura 3.</b> Diente de Bovino. a) Cara vestibular y b) cara lingual de un incisivo inferior... 16	
<b>Figura 4.</b> Estructura de la colágena, a) cadena $\alpha$ de aminoácidos que componen la colágena, b) estructura triple hélice de la colágena y c) formación de las fibras de colágena .....	18
<b>Figura 5.</b> Síntesis de la colágena. ....	21
<b>Figura 6.</b> Enantiómeros del ácido láctico.....	22
<b>Figura 7.</b> Fórmula química del PLA.....	23
<b>Figura 8.</b> Síntesis de la lactida. ....	24
<b>Figura 9.</b> Sistema del electrohilado. ....	30
<b>Figura 10.</b> Microscopio electrónico de barrido.....	33
<b>Figura 11.</b> Movimientos de vibración de una molécula.....	36
<b>Figura 12.</b> Interferómetro de Michelson.....	37
<b>Figura 13.</b> Método de obtención de colágena de dentina de bovino.....	44
<b>Figura 14.</b> a) Espectro de la dentina de origen de bovino. Se observan las bandas características de la dentina, basándonos en la descripción de Luciano Bachmann y colaboradores. b) Amplificación del espectro de dentina de bovino en la zona de las bandas que corresponde al material orgánico.....	54
<b>Figura 15.</b> Espectroscopia por dispersión de energía de rayos X de la dentina de bovino. a) Micrografía de la dentina de bovino a una amplificación de 1000 X, donde se observan los túbulos dentinarios (flecha) y en el recuadro rosa, se enmarca la zona donde se realizó el análisis de elementos. b) Espectro del análisis de la dentina. c) Tabla de los resultados de los elementos que se encuentran presentes en la dentina.....	55
<b>Figura 16.</b> Espectro de infrarrojo de CoD.....	57
<b>Figura 17.</b> Comparación de los espectros infrarrojos de la muestra control y la experimental. Espectro de la colágena tipo I de piel de becerro (CoC) y el espectro de la colágena de dentina de bovino obtenida (CoD). ....	58
<b>Figura 18.</b> Micrografías de SEM de dos tipos de colágena, a) CoD y b) CoC, los círculos marcan los poros y en las flechas las fibras. Aumentos 1000 X.....	60

**Figura 19.** EDS de la muestra de CoD, en a) se observa la zona en donde se realizó el análisis, b) el espectro que indica la presencia de elementos como C, O y N y c) tabla con él % de los elementos encontrados. .... 62

**Figura 20.** Termograma de CoD, a una velocidad de calentamiento de 10 oC/min. .... 63

**Figura 21.** Termograma de CoC, a una velocidad de calentamiento de 10 oC/min. .... 64

**Figura 22.** Termograma de DSC de CoC y CoD. .... 65

**Figura 23.** Micrografías de andamios de PLA al 13%, con un voltaje de 10 kV. Se observa el efecto de la distancia en los andamios sobre las fibras, a) 10 cm, b) 15 cm, c) 25 cm, a 2000 X. .... 67

**Figura 24.** Micrografías de SEM de andamios de PLA 13%, a) 10 kV - 10 cm; b) 10 kV - 15 cm; c) 10 kV -25cm; d) 13 kV –10 cm; e) 13 kV - 15 cm; f) 13 kV – 25 cm.; g) 20 kV- 10 cm; h) 20 kV- 15 cm; i) 20 kV-25 cm. Micrografías a X 2000 y escala 10 micras..... 69

**Figura 25.** Micrografías de SEM de andamios de PLA:CoD (30:1) al 13% en TFE p/v, a) 10 kV - 10 cm; b) 13 kV - 10 cm; c) 10 kV -15cm; d) 13 kV–15 cm; e) 10 kV - 25 cm; f) 13 kV – 25 cm. Micrografías a X 2000 y escala de 10 micras..... 71

**Figura 26.** Imágenes de microscopía de barrido de andamios de PLA en TFE al 16%. Andamios electrohilados a) 10 kV - 10 cm; b) 13 kV-10 cm; c) 10kV -15cm; d) 13 kV – 15 cm; e) 10 kV - 25 cm; f) 13 kV – 25 cm. Micrografías a 2000 X y escala 10 micras..... 73

**Figura 27.** Imágenes de microscopía de barrido de andamios de PLA en TFE/AC al 16%. Andamios electrohilados a) 10 kV - 10 cm; b) 13 kV-10 cm; c) 10kV -15cm; d) 13 kV – 15 cm; e) 10 kV - 25 cm; f) 13 kV – 25 cm. Micrografías a 2000 X y escala 10 micras..... 74

**Figura 28.** Imágenes de microscopía de barrido de las fibras de la solución CF16 (30:1), a) 10 kV - 10 cm; b) 13 kV - 10 cm; c) 10kV -15cm; d) 13 kV – 15 cm; e) 10 kV - 25 cm; f) 13 kV – 25 cm. Micrografías a 2000 X y escala de 10 micras. .... 76

**Figura 29.** Micrografías de SEM de los andamios de PLA: CoD (30:1) al 16 % en TFE/AC, a) 10 kV - 10 cm; b) 13 kV - 10 cm; c) 10kV -15cm; d) 13 kV – 15 cm; e) 10 kV - 25 cm; f) 13 kV – 25 cm. Micrografías a 2000 x y escala de10 micras..... 77

**Figura 30.** Micrografías de las fibras electrohiladas de la solución C5F16, a) 10 kV - 10 cm; b) 13 kV - 10 cm; c) 10kV -15cm; d) 13 kV – 15 cm; e) 10 kV - 25 cm; f) 13 kV – 25 cm. Micrografías a 2000 X y escala de 10 micras..... 79

**Figura 31.** Imágenes de SEM de los andamios electrohilados de la solución. C5T-A16, a) 10 kV - 10 cm; b) 13 kV - 10 cm; c) 10kV -15cm; d) 13 kV – 15 cm; e) 10 kV - 25 cm; f) 13 kV – 25 cm. Micrografías a 2000 x y escala 10 micras. .... 80

**Figura 32.** Gráfica del efecto del disolvente y la distancia en los andamios electrohilados de PLA 16%. .... 81

**Figura 33.** Gráfica del efecto del disolvente y la distancia en los andamios electrohilados de PLA: CoD (30:1) 16%. .... 82

**Figura 34.** Gráfica del efecto del disolvente y distancia en los andamios electrohilados de PLA: CoD (15:1) 16%. .... 83

**Figura 35.** Gráfica de resistencia a la tensión de los andamios de PLA y PLA: CoD. .... 87

**Figura 36.** Imagen de SEM de andamios de PLA/TFE/AC al 16%, a) micrografía del andamio antes de la prueba en tensión, b) después de la prueba en tensión. .... 88

**Figura 37.** Ángulo de contacto, a) imagen de la gota depositada en el andamio de PLA: CoD 15:1 en TFE/AC, b) medición de ángulo de contacto. .... 89

**Figura 38.** Gráfica de los ángulos de contactos de los andamios de PLA y PLA: CoD, A) PLA/TFE, B) PLA/TFE/AC, C) PLA:CoD (30:1) TFE, D) PLA:CoD (30:1) TFE/AC, E) PLA:CoD (15:1) TFE y F) PLA:CoD (15:1) TFE/AC..... 90

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Andamios electrohilados de PLA.....	28
Tabla 2. Soluciones para preparar los andamios. ....	45
Tabla 3. Parámetros para electrohilar. ....	47
Tabla 4. Asignación de señales del infrarrojo de la colágena.....	57
Tabla 5. Andamios con los parámetros finales.....	84
Tabla 6. Área porosa de los andamios.....	85

## “Obtención de andamios por electrohilado de poli(ácido láctico) y colágena de dentina de bovino”

### RESUMEN

**Palabras claves:** técnica del electrohilado, fibras, porosidad, resistencia a la tensión.

Las enfermedades como caries o pulpitis pueden ser causa de la pérdida prematura de la dentina. Una opción para la regeneración de este tejido es la ingeniería de tejidos, la cual es una interdisciplina encargada de restaurar y regenerar tejidos. En la ingeniería de tejidos los andamios son matrices porosas en donde se lleva a cabo la diferenciación y el crecimiento de células. Bajo esta interdisciplina se han elaborado andamios por electrohilado de poli(ácido láctico) (PLA), por ser un material biocompatible y biodegradable que puede ser usado para la fabricación de andamios que den soporte a células en crecimiento. Así mismo el objetivo de este trabajo fue la obtención de andamios electrohilados de PLA con colágena extraída de dentina de bovino (CoD) ya que la colágena favorece el crecimiento celular. El procedimiento para la extracción de la colágena de dentina de bovino constó de la desmineralización del material inorgánico de dentina, por medio de ácido clorhídrico al 0.6 M. La colágena obtenida fue caracterizada por espectroscopia de infrarrojo y microscopía electrónica de barrido. Se encontraron parámetros para el electrohilado y se obtuvieron andamios de la mezcla de PLA:CoD. Los andamios fueron caracterizados por microscopía electrónica de barrido: se midieron los diámetros de las fibras y el área porosa relativa. Se utilizó un goniómetro para determinar el ángulo de contacto de los andamios y, por último, se les realizó un ensayo en tensión para conocer sus propiedades mecánicas.

Por medio de la espectroscopia infrarroja de la colágena se detectaron bandas en las longitudes de onda de 3300, 1631, 1539 y 1234  $\text{cm}^{-1}$ , características de la colágena. El diámetro promedio de las fibras de los andamios de PLA:CoD fue de  $442 \pm 92\text{nm}$ , con un área porosa de 78.5%. Los andamios presentaron un ángulo de contacto de  $123^\circ \pm 2.3^\circ$  y su resistencia a la tensión fue de 1.1 MPa. En conclusión, el procedimiento de tres lavados con ácido clorhídrico 0.6 M fue el adecuado para obtener colágena sin desnaturalizar. Los parámetros óptimos para obtener fibras de PLA:CoD por la técnica del electrohilado fueron: utilizar una concentración del 16% en un sistema de disolventes (trifluoroetanol/ácido acético), una distancia de la salida de la aguja hacia el colector de 25 cm, con un voltaje de 10 kV y un calibre de aguja de 0.80 mm. La adición de ácido acético a la solución de PLA en trifluoroetanol provocó la disminución del diámetro de las fibras. Igualmente, la adición de la colágena produjo el mismo efecto en el diámetro promedio de las fibras.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, en el campo de la odontología, las enfermedades principales que conllevan a la pérdida de los dientes son la caries dental y la periodontitis apical. Estos problemas tratan de ser solucionados mediante la ingeniería de tejidos, la cual es una interdisciplina que busca, por medio de la biología celular, de la fisiología, la bioquímica y la ingeniería de materiales, la restauración y función de tejidos, para darles a los pacientes una mejor salud y calidad de vida.<sup>1</sup> Esta interdisciplina ha buscado regenerar piel, hueso, pulpa dental, cartílago y tejido nervioso, principalmente con células troncales, con la ayuda de andamios para el crecimiento de células y biomoléculas tales como citosinas o factores de crecimiento que favorecen la diferenciación de las células.<sup>2</sup>

Las células para llevar a cabo su proliferación y diferenciación dependen de la composición y de la estructura del andamio, para regenerar el tejido deseado. De tal manera que los andamios deben ser porosos, con estabilidad física y química para el tiempo que estará en el cuerpo y deben tener propiedades mecánicas para soportar las células y su ambiente. Se han empleados diferentes polímeros para fabricar andamios. Sin embargo, los polímeros deben presentar algunas características como ser biocompatibles, biodegradables, fáciles de esterilizar y con propiedades que soporten las cargas a las que son sometidos.

El electrohilado es un proceso que se ha utilizado para elaborar andamios de polímeros sintéticos como poli(ácido láctico) (PLA), poliuretano (PU), poli( $\epsilon$ -caprolactona (PCL) y otros. Entre los polímeros naturales que son utilizados para



producir andamios tenemos a los glicosaminoglucanos, la gelatina, el quitosano, los alginatos y la colágena. El PLA es un poliéster alifático que posee propiedades de degradación y está aprobado por la Food and Drug Administration (FDA).<sup>3</sup> Este polímero, en combinación con la hidroxiapatita, se utilizó para el crecimiento de células óseas y se logró la diferenciación, proliferación y mineralización de osteoblastos.<sup>4</sup> Por otra parte, la colágena es una proteína que constituye la matriz extracelular de varios tejidos, la cual puede ser incluida en andamios para favorecer el crecimiento y la diferenciación de células. La colágena tipo I de piel de becerro se empleó para realizar andamios con fibras de  $100 \pm 40$  nm sin embargo presenta propiedades mecánicas pobres.<sup>5</sup> Esta proteína, en combinación con PLA, ha demostrado ser apropiada para producir andamios para el crecimiento y la diferenciación de células osteoblasticas.<sup>6</sup>

La matriz del tejido nervioso se encuentra compuesta principalmente por dos tipos de colágenas: tipo I y III. Los andamios electrohilados de poli(ácido láctico)-co-poli( $\epsilon$ -caprolactona) y colágena tipo I y III presentaron mayor crecimiento celular para la regeneración de tejido nervioso, comparado con los andamios con solo un tipo de colágena. Las proteínas similares a las de la matriz extracelular del tejido que se desea regenerar son muy importantes para la elaboración del andamio.<sup>7</sup>

Finalmente, se ha demostrado que la composición de los andamios para la proliferación de células de pulpa dental es un factor muy importante. En un estudio se comparó la proliferación de células de pulpa dental humana *in vivo* con tres andamios de diferente composición; de poli (ácido láctico), colágena y de fosfato de calcio. En donde se encontró mayor crecimiento celular en el andamio de poli (ácido láctico) y de colágena.<sup>8</sup>

Por medio de la ingeniería de tejidos se busca la generación de la dentina, sin embargo para conseguir este objetivo es necesario elaborar y obtener andamios con propiedades físicas y químicas que puedan favorecer su uso en la regeneración de este tejido. Por lo cual, en busca de estos andamios, en este trabajo se fabricaron andamios electrohilados de PLA con colágena extraída de la dentina de bovino para obtener andamios con fibras de un diámetro entre 50 y 500 nm, similar a la matriz extracelular de los tejidos. Se evaluaron sus propiedades mecánicas en tensión uniaxial, la porosidad y su características hidrofóbicas de estos andamios elaborados.

# CAPÍTULO I: FUNDAMENTO TEÓRICO

## Ingeniería de Tejidos

Uno de los problemas más costosos para la salud es la pérdida de un tejido u órgano. Este hecho afecta al paciente tanto en la función como en el aspecto psicológico. Para lograr dar una solución a este problema, se ha empleado la trasplatación de órganos o el remplazo de un tejido por medio de autoinjertos, aloinjertos (de la misma especie pero diferente individuo), heteroinjertos (otra especie, tal como bovino) o dispositivos metálicos. Sin embargo, aún se han encontrado limitaciones con dichos tratamientos porque se pueden presentar problemas como por ejemplo; escasez de donadores, poca integración y reacciones inmunológicas en el receptor.<sup>9</sup> Para superar estos inconvenientes se han realizado avances en la medicina con la integración de disciplinas como la biología, la ingeniería y las ciencias básicas para dar origen a una interdisciplina, conocida hoy en día como la **ingeniería de tejidos**.<sup>10</sup> El concepto fue propuesto en los Estados Unidos en la mitad de los 80s para reducir la falta de donadores para el trasplante de órganos.<sup>11</sup>

La ingeniería de tejidos tiene como objetivo la búsqueda de nuevas terapias para la regeneración, reparación o remplazo de un tejido u órgano, debido a la pérdida por un traumatismo, por enfermedades crónicas degenerativas o por malformaciones congénitas. Para lograr el fin de esta interdisciplina se debe tener en cuenta cuatro aspectos claves: las células, un andamio que imite la matriz extracelular del tejido a regenerar, señales que favorezcan la diferenciación de las células y la tecnología de

biorreactores (Figura 1). Las células son cultivadas en andamios a los cuales se les agrega o no factores de crecimiento, en una atmosfera propicia controlada por los biorreactores, con el fin de obtener crecimiento de tejido.<sup>12</sup>

En los últimos años, gracias a la ingeniería de tejidos, se ha desarrollado una terapia para la regeneración de piel, así como el remplazo de tejido óseo en defectos grandes, la formación de cartílago,<sup>13</sup> así como también importantes avances en la regeneración de la articulación temporomandibular, el ligamento periodontal, la dentina y la pulpa.<sup>14,11</sup>

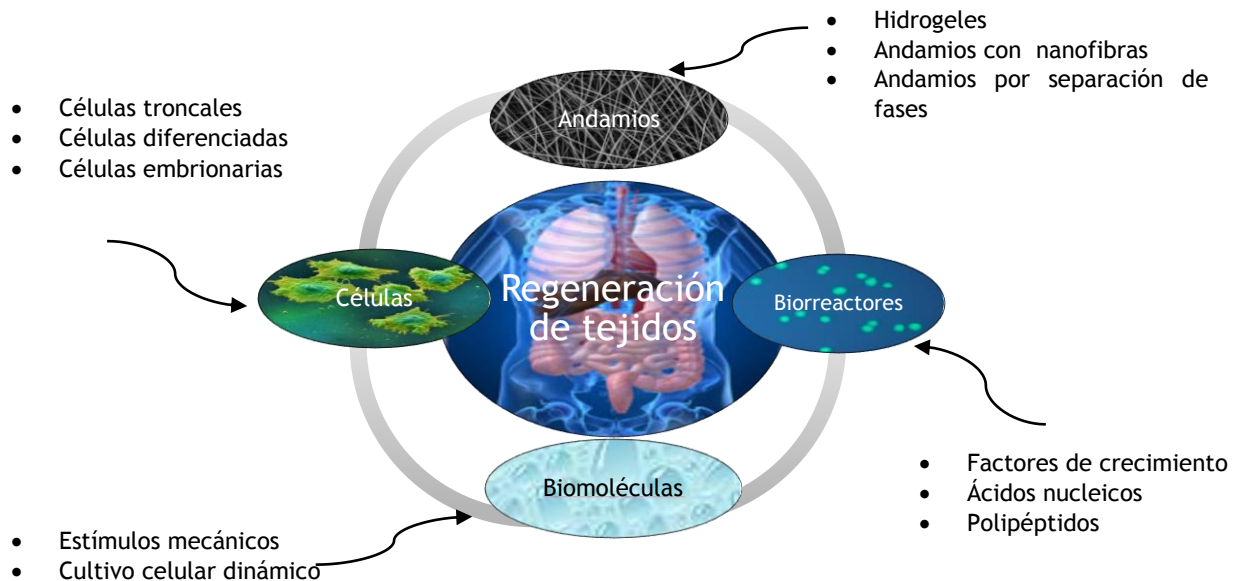


Figura 1. Esquema de la ingeniería de tejidos.<sup>12</sup>

## Células en la Ingeniería de Tejidos

Las células en la ingeniería de tejido juegan un papel importante para poder llevar a cabo la regeneración o reparación de un tejido. Bajo esta interdisciplina, las células ideales deben ser fáciles de obtener y de expandir, conservar el fenotipo, mantener su función y ser multipotenciales para diferenciarse en células especializadas que sean específicas del tejido que se requiera regenerar y, finalmente, no deben activar una respuesta inmune. Comúnmente se utiliza células adultas diferenciadas. Para obtener estas células es necesario realizar una biopsia al tejido donador, posteriormente la muestra del tejido se digiere enzimáticamente para liberar las células del tejido, las cuales son disociadas y cultivadas para la expansión. Estas células pueden ser reimplantadas directamente en el tejido del huésped o ser agregadas junto con un soporte de matriz (andamio) y entonces reimplantarlo en el huésped. Sin embargo, la capacidad de proliferación de las células diferenciadas es muy limitada. Por tal motivo, en investigaciones, se busca potencializar a las células troncales, que son un tipo de células no especializadas, las cuales cuando se encuentran en presencia de señales específicas que son capaces de autorenovarse y diferenciarse, para generar múltiples tipos de células diferenciadas.<sup>15</sup>

La etapa de desarrollo del tejido define si las células troncales se clasifican en células troncales adultas o en células troncales embrionarias. Las células troncales adultas se pueden encontrar en diferentes tejidos por ejemplo: en la médula ósea, en los tejidos adiposos, pulpar, nervioso, muscular, entre otros. Las células troncales embrionarias son células pluripotenciales obtenidas de la masa celular interna del blastocisto o células aisladas de la cresta gonadal (etapas del desarrollo embrionario). Este último

linaje de células son atractivas candidatas para el uso en la ingeniería de tejidos. Con el desarrollo de técnicas para cultivar de células troncales humanas se podría conducir a la regeneración de tejidos, órganos, así como también para el desarrollo de tratamientos para combatir el cáncer, traumas, tejidos deteriorados, osteoporosis, Alzheimer entre otras enfermedades.<sup>12</sup>

## **Células en la Regeneración Dental**

La ingeniería de tejidos también es aplicada en el campo de la odontología, de tal forma que se han encontrado varios linajes celulares potenciales para ser usadas en la regeneración de estructuras dentales.<sup>16</sup> Las células troncales de la pulpa dental (siglas en ingles DPSC) tienen la capacidad para diferenciarse en odontoblastos, adipocitos, condrocitos, osteoblastos y neuronas. Las células troncales de dientes temporales exfoliados (siglas en ingles SHED) tiene la capacidad de multiplicarse más rápido en comparación con las células DPSC. Las células troncales del ligamento periodontal, por sus siglas en ingles PDLSC, son capaces de diferenciarse en cementoblastos, adipocitos y tejido conectivo rico en colágena. Las células troncales de la papila apical (siglas en ingles SCAP) fueron implantadas *in vivo* en andamios de hidroxiapatita y fosfatos de calcio, como resultado se logró la diferenciación en odontoblastos capaces de regenerar una capa de dentina y tejido conectivo sobre la superficie del andamio. También se ha demostrado que tienen la capacidad de regenerar el ligamento periodontal y el hueso alveolar.<sup>11, 15, 17</sup>

## Andamios

En la ingeniería de tejidos, los andamios se consideran una matriz porosa que tienen la intención de imitar a la matriz extracelular, para promover la regeneración o reparación de un tejido. Su principal función es dar el soporte adecuado a las células implantadas en él, para que consecutivamente se lleve a cabo la adhesión, la migración, la proliferación y la diferenciación de las células sobre el andamio y, posteriormente, reemplazar el andamio por el tejido nuevo a regenerar.<sup>11,12,18</sup> Los andamios, por ser un sustituto de la matriz extracelular, deben cumplir con varios requerimientos biomecánicos, químicos y físicos. Los andamios deben presentar propiedades mecánicas apropiadas para permitir la adhesión celular y facilitar el desarrollo del tejido a regenerar. Las propiedades físicas y químicas características que debe tener un andamio son: que sea una estructura tridimensional y porosa, debido a que es necesaria para la difusión de nutrientes y residuos a través de los andamios. El tamaño de poro adecuado depende del tipo de célula que será sembrada en él. Por último, los andamios deben ser biocompatibles, se deben absorber y deben presentar una superficie que facilite la migración celular.<sup>9,14</sup>

En la actualidad existen diferentes técnicas para la fabricación de andamios: separación de fase, el autoensamblaje y el electrohilado.<sup>19</sup> El autoensamblaje es un proceso en el que un sistema desordenado de componentes moleculares (péptidos, DNA) forman una estructura tridimensional, como consecuencia de las interacciones no covalentes de las regiones específicas de las moléculas. La técnica de separación de fase consiste en hacer una solución polimérica, posteriormente una gelación por enfriamiento, seguida de la extracción del solvente del gel con agua, que

subsecuentemente es retirada mediante la liofilización. Esto da lugar a la formación de una membrana porosa. Finalmente, el electrohilado es una técnica que permite formar redes de filamentos, a partir de una solución polimérica a la cual se le aplica un voltaje. Este último proceso es mencionado a mayor detalle al final de este capítulo.<sup>3, 20</sup>

### **Biomoléculas para la Ingeniería de Tejidos.**

Los biólogos han enfocado su trabajo en la identificación y aislamiento de biomoléculas responsables de la formación y reparación de tejidos. Se ha demostrado que estas biomoléculas pueden ser factores para la diferenciación de células y para poder mantener su fenotipo. De esta manera, en la ingeniería de tejidos, se incorpora la liberación de las biomoléculas en el sistema célula- andamio. Por lo tanto, la célula reconocerá la biomolécula para la proliferación y diferenciación, así como también, para poder secretar su propia matriz para la regeneración del tejido. Las biomoléculas usadas con más frecuencia en la ingeniería de tejidos son: proteínas, factores de crecimiento y secuencias genéticas.<sup>12</sup> Las proteínas y polipéptidos se han utilizado con éxito en varias investigaciones para la regeneración de piel y de hueso.<sup>21</sup> Sin embargo, hay que tener en cuenta que las proteínas son complejas y su función depende mucho de su composición química y de su integridad estructural. La principal función de los factores de crecimiento de composición proteica es el control externo del ciclo celular. Los factores de crecimiento van a promover la proliferación celular, la diferenciación, la migración en la localización deseada y el crecimiento celular a lo largo de la matriz del tejido a regenerar. Las secuencias genéticas (DNA y RNA) actúan sobre la



transcripción o transducción genética o como la liberación de conjuntos de genes que afecta el genoma celular.<sup>22</sup>

## **Biorreactores**

La aparición de nuevas tecnologías en los biorreactores ha dado un gran giro a la ingeniería de tejidos. Los biorreactores son sistemas construidos para crecer células o tejidos, en donde es importante controlar varios parámetros, para simular las condiciones ambientales del crecimiento de células sobre los andamios y la formación del tejido, todo esto como si fuera *in vivo*. Algunas de las variables controladas por los biorreactores son: las señales mecánicas, la temperatura, el pH, la ruta del fluido, las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono y las estimulaciones específicas que se requieran para regenerar el tejido. Todas estas condiciones son con el propósito de formar un ambiente adecuado para la proliferación y diferenciación de células.<sup>12,23</sup>

## **Matriz Extracelular (MEC)**

La matriz extracelular es un conjunto de estructuras y proteínas organizadas que forman una ultraestructura tridimensional. La MEC es específica para cada tejido y órgano. A la matriz extracelular se le confieren diferentes características funcionales: ayuda a organizar a las células en tejidos, coordina las funciones celulares que activa las vías de señalización intracelular, las cuales controlan el crecimiento celular, la proliferación y la expresión genética. Además, sirve como amortiguadora, debido a las

fibras de colágena que la constituyen. De tal manera que la ingeniería de tejidos busca imitar la matriz extracelular de cada tejido a regenerar.<sup>24</sup>

En la matriz extracelular abundan tres tipos de moléculas:

Los proteoglicanos: altamente viscosos, grupo de glicoproteínas que amortiguan el contacto entre las células y unen una gran variedad de moléculas extracelulares.

Las fibras de colágena que proveen fuerza mecánica y elasticidad.

Las proteínas multiadhesivas de la matriz soluble que fijan e interconectan los receptores de adhesión de la superficie celular y otros componentes de la matriz extracelular.<sup>25, 26</sup>

## **Dentina de Humano**

La estructura dental se encuentra conformada por diferentes tipos de tejidos, los cuales son: esmalte, dentina, pulpa dental, cemento, tejido periodontal y hueso alveolar. La dentina es un tejido mineralizado que conforma el eje estructural de un órgano dental. La porción coronaria se encuentra recubierta por el esmalte y la región radicular revestida por el cemento. Sin embargo, en el interior de la pieza dental, la dentina delimita una cavidad que corresponde a la cámara pulpar, la cual aloja la pulpa dental. En el hueso alveolar se aloja la pieza dental y el tejido periodontal une al diente con el hueso alveolar (Figura 2).

El espesor de la dentina en un órgano dental varía dependiendo de la pieza dental, la cual va desde 1 hasta los 3 mm. En la dentina podemos encontrar dos componentes: la matriz mineralizada y los túbulos dentinarios, los cuales alojan los procesos odon-

Figura 2. Estructura dental. <sup>28</sup>

toblásticos. Estos son largas prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos, cuyos cuerpos se encuentran en la región periférica de la pulpa. Los odontoblastos son células responsables de la formación y mantenimiento de la dentina.<sup>27</sup>

La composición química de la dentina la conforma, aproximadamente, un 70% de materia inorgánica (hidroxiapatita), el 18% corresponde a la materia orgánica, principalmente fibras de colágena que conforman la matriz extracelular de este tejido, y el 12 % es agua.<sup>29</sup> La matriz orgánica, a su vez, se compone de un 90% de colágena (colágena tipo I, III, V y VI) y un 10% de proteínas no colágenas, entre estas proteínas se encuentran las siguientes: la fosforina dentinaria, la sianoproteína dentinaria, la amelogenina, la osteocalcina, la osteonectina, la osteopontina, los proteoglicanos, la alúmina, los fosfolípidos y los factores de crecimiento, entre otras.<sup>30</sup>

Por otra parte, la matriz inorgánica corresponde a los cristales de hidroxiapatita, con un tamaño de 36  $\mu\text{m}$  de longitud, 20  $\mu\text{m}$  de ancho y 10  $\mu\text{m}$  de altura, son muy

similares al del tejido óseo. Estos cristales se posicionan paralelos a las fibras de la colágena y en los espacios entre las moléculas de la colágena. En la matriz inorgánica también se pueden localizar fracciones de fosfatos amorfos, carbonatos, sulfatos y oligómeros.

La dentina tiene características específicas; es un tejido de color blanco amarillento, con una translucidez menor que el esmalte, presenta una elasticidad que permite amortiguar los impactos de la masticación, su módulo elástico en los dientes permanentes oscila entre los 18 y los 25 GPa. Su permeabilidad es mayor al esmalte debido a la presencia de túbulos dentinarios que permiten el paso de solutos.<sup>31</sup>

## **Dentina de Bovino**

Morfológicamente e histológicamente los dientes de bovino son muy similares a los dientes de seres humanos, por lo cual, los dientes de bovino son ideales como sustitutos de los dientes humanos en investigaciones sobre materiales dentales.<sup>32</sup>

Los dientes de bovino presentan una corona y una raíz con un estrechamiento entre los dos que es el cuello, y tiene una pulpa de mayor tamaño comparado con los dientes humanos. Además estas piezas dentales presentan esmalte, dentina y cemento con morfología similar a las piezas dentales de humanos (Figura 3).

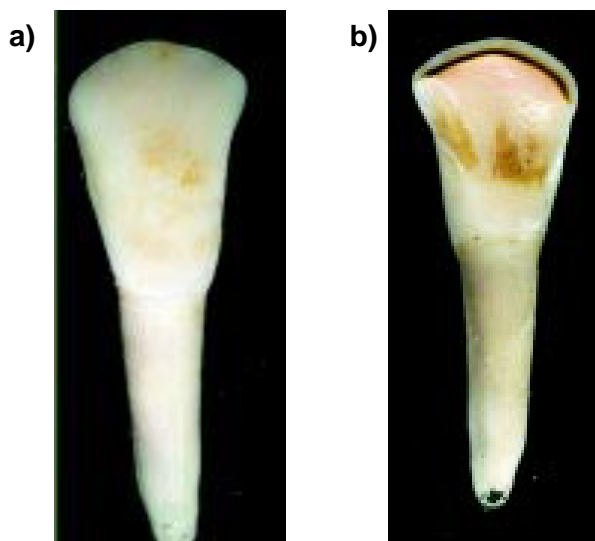


Figura 3. Diente de Bovino. a) Cara vestibular y b) cara lingual de un incisivo inferior.<sup>33</sup>

La dentina de bovino es dura y ligeramente amarillenta, que en capas forma al diente y presenta una cavidad interna, ocupada por la pulpa dental.<sup>33</sup>

La dentina de bovino está conformada por túbulos dentinarios. Los cuales atraviesan todo el espesor al seguir un trayecto en forma de S desde la unión amelodentinaria hasta la pulpa. En comparación con los dientes humanos, en los dientes de bovino la disposición de los túbulos dentinarios es más irregular y el diámetro y la cantidad de los túbulos es mayor. El diámetro de los túbulos dentinales de bovino en la porción media de la dentina es de 2-2.4  $\mu\text{m}$  y en los humanos es de 1.2 -1.5  $\mu\text{m}$ . La cantidad de túbulos dentinarios cerca del esmalte de los dientes de bovinos es de 24000-26026 por  $\text{mm}^2$  y en los humanos es 20000-23000 túbulos por  $\text{mm}^2$ .<sup>34</sup>

En cuanto al análisis químico, con espectrometría de emisión, se encontró que tanto en los dientes bovinos y humanos hay similitud en el tipo de elementos que los

constituyen. Con respecto a las propiedades mecánicas en resistencia a la compresión para la dentina de bovino es de 204.13 MPa, mientras que para la dentina humana es de 297 MPa; el módulo elástico de la dentina de bovino es de 9.48 GPa y en la dentina de humanos es de 18.3 MPa.<sup>33,35</sup>

## Colágena

La colágena es la proteína que se encuentra en un mayor porcentaje en el cuerpo humano. La principal función de la colágena, en un tejido normal, es mantener una integridad estructural y proveer de determinada flexión y resistencia a la tensión al tejido.<sup>36</sup>

La molécula de la colágena está constituida por tres cadenas polipéptidicas llamadas cadenas  $\alpha$ . Estas tres cadenas se enroscan entre sí, unidas por puentes de hidrogeno, para formar una triple hélice dextrógira (Figura 4 b). Cada cadena polipéptidica  $\alpha$  está formada por una secuencia de (Gly-X-Y), donde X y Y son frecuentemente amino ácidos de prolina y 4-hidroxiprolina (Figura 4 a).<sup>37</sup>

Las cadenas  $\alpha$  que forman la hélice no son todas iguales; su tamaño varía desde los 600 hasta los 3000 amino ácidos. En la actualidad se han descubierto más de 28 tipos de colágenas diferenciados entre sí, principalmente, por la combinación de cadenas alfas, por las funciones específicas que provee a nuestro cuerpo y por la interacción con proteoglicanos, células u otras proteínas. Los tipos de la colágena se designan con los números romanos del I al XXVIII.

Las moléculas de colágena se alinean cabeza con cola en hileras que se superponen parcialmente y dejan una brecha entre las moléculas de cada hilera y un desfase de un cuarto de molécula entre la hilera contiguas de esta manera se van formando las fibras de colágena (Figura 4 c).<sup>38,39</sup>

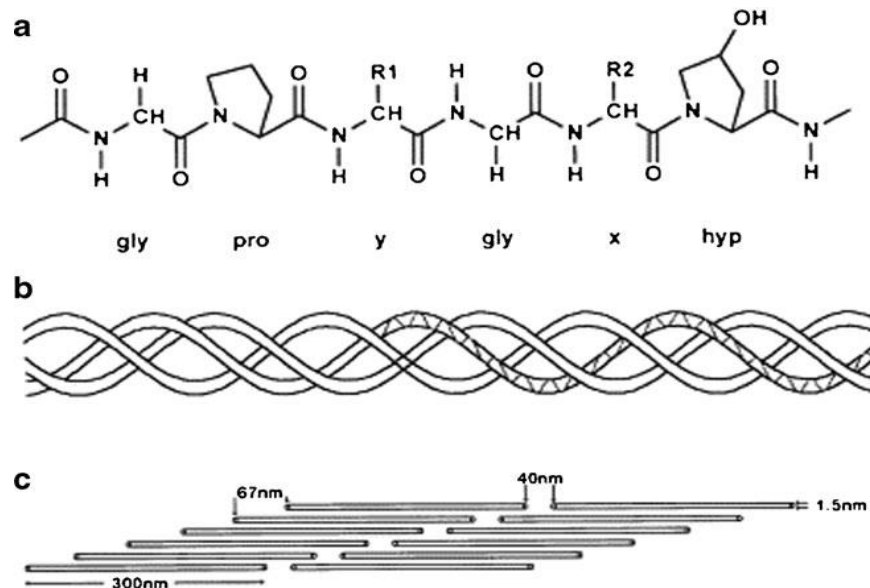


Figura 4. Estructura de la colágena, a) cadena  $\alpha$  c por aminoácidos que componen la colágena, b) estructura triple hélice de la colágena y c) formación de las fibras de colágena.<sup>39</sup>

## Biosíntesis de la Colágena

La colágena es la proteína más abundante en el cuerpo humano, lo cual representa el 30% del total de contenido proteico. Para la formación de una molécula de colágena hasta la formación fibras de colágenas, es necesaria la consecución de varios pasos tanto intracelulares como extracelulares, que contribuyen a la formación de la estructura para alcanzar las propiedades mecánicas de una fibra de colágena final.<sup>40</sup>

El proceso de biosíntesis de la molécula de colágena ocurre en orgánulos limitados por membranas dentro de la célula. Los orgánulos principales son: los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso, el cual es una región de la célula donde se produce la síntesis y la modificación de las proteínas neosintetizadas. El aparato de Golgi se encarga de modificar, clasificar y envasar proteínas y lípidos para su transporte intra y extracelular.<sup>41</sup>

Dado que existen más de 28 tipos de colágenas, es necesaria la codificación de un gen específico para cada tipo de colágena, posterior a la codificación del DNA se transcribe a RNA mensajero (RNAm), el RNAm se une al ribosoma del retículo endoplasmático y en este lugar se realiza la transducción del RNAm a cadenas  $\alpha$  de la procolágena, cada cadena  $\alpha$  polipeptídica se encuentra compuesta por la repetición de la secuencia de los amino ácidos de Gly, X, Y, donde Gly es glicina y en donde la posición X y Y corresponde a otros aminoácidos, que por lo regular son los aminoácidos de prolina e hidroxiprolina o hidroxilisina. Después, las cadenas  $\alpha$  de la procolágena pasan a las cisternas del retículo endoplasmático rugoso, para la transformación de los residuos de prolina a hidroxiprolina y de los residuos de lisina a hidroxilisina. Posteriormente, se lleva a cabo la glucosilación de la hidroxilisina en el O-ligando, en donde se involucra el acoplamiento de galactosa, seguida de la glucosa. Las cadenas  $\alpha$  del procolágena hidroxiladas y con la glucosilación, se asocian para la formación de la molécula de la procolágena. Para realizar este paso es necesaria la alineación y asociación no covalente de las tres cadenas  $\alpha$  a través de los dominios C-propeptídico de la procolágena. Estos dominios implican el reconocimiento específico de las cadenas, para asegurar la correcta estequiometría de la colágena y



para la formación de núcleos estables, que favorecen el plegado de la triple hélice. Las tres cadenas  $\alpha$  se estabilizan entre sí por puentes de disulfuro intra e intermolecular, que se forman debido a la catálisis de la enzima prolil 4-hidroxilasa (P4H) y de la proteína disulfuro isomerasa (PDI), que cambian la configuración de los enlaces de la prolina. En el proceso de la formación de la triple hélice también se ve involucrada la participación de la HSP47, que es el chaperón molecular de la colágena, la cual se une al doblamiento de la triple hélice, para estabilizar la molécula helicoidal e impedir la aglomeración prematura de los trímeros. Cabe mencionar que la conformación de la triple hélice de la procolágena fibrilar se inicia con el plegamiento en dirección C-terminal a N-terminal.

Después de la síntesis en el retículo endoplasmático, las moléculas de procolágena pasan al aparato de Golgi, en donde se aglomeran y se envuelven en vesículas de secreción para ser transportadas a la superficie celular. Las moléculas de la procolágena se convierten en moléculas de colágena madura, con la ayuda de la enzima procolágena C-peptidasa y procolágena N-peptidasa, ambas enzimas seccionan los extremos carboxilo y amino terminal, respectivamente, de la procolágena (son cortas regiones en los extremos de la molécula de la procolágena sin formación de triple hélice). Finalmente, en el espacio extracelular de la superficie de la célula, las moléculas de colágena se forman cabeza con cola y también se aglomeran lateralmente. Posteriormente realizan un entrecruzamiento molecular por enlaces covalentes, con la ayuda de la enzima lisil oxidasa, entre los grupos aldehído de la lisina y de la hidroxilisina que se encuentran en los residuos de la N- y C-terminal

del telopéptido de la colágena madura (los telopéptidos no tienen secuencia de Gly, X, Y) para formar así fibrillas de colágena (Figura 5).<sup>31,38</sup>

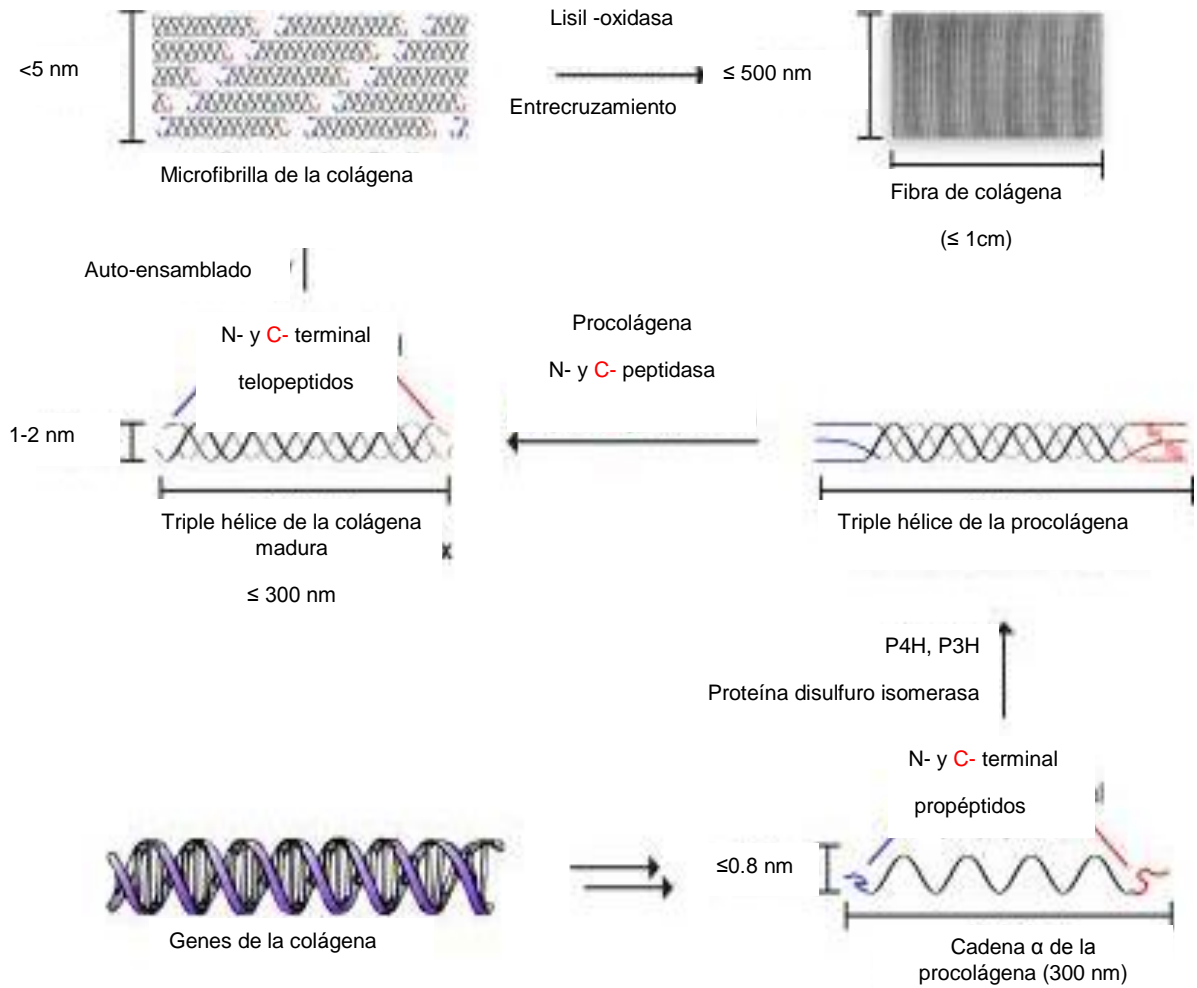


Figura 5. Síntesis de la colágena.<sup>42</sup>

## Poli(ácido láctico)

El poli(ácido láctico)(PLA) es un polímero biodegradable que pertenece a la familia de los poliésteres alifáticos que proviene de la clase de los  $\alpha$ -hidróxi -ácidos (Figura 7).

En general, es un polímero termoplástico que presenta alta resistencia a la tensión

(59 MPa) y un módulo de Young elevado (2.7 GPa). Este polímero se utiliza en la industria para el área de empaquetamiento. Además el poli(ácido láctico) es biocompatible, bioabsorbible, no tóxico y se encuentra aceptado por la FDA (Food and Drug Administration). Por éstas características, se emplea en el sector farmacéutico, para dispositivos médicos y en la ingeniería de tejidos.<sup>43</sup>

## Ácido Láctico

El monómero que corresponde a la unidad básica para realizar la síntesis del PLA es el ácido láctico. Fue descubierto en 1780 por Carl Scheele en la fermentación de la leche y, posteriormente, se comercializó en 1881. El ácido láctico es empleado en la industria de alimentos como acidulante y conservante y también se emplea en la industria de los cosméticos, los productos farmacéuticos.<sup>44</sup>

El ácido láctico (ácido 2-hidroxipropiónico) posee un carbono asimétrico, el cual permite dos configuraciones ópticas conocidas como L ácido láctico y D ácido láctico (dextro y levo) Figura 6.

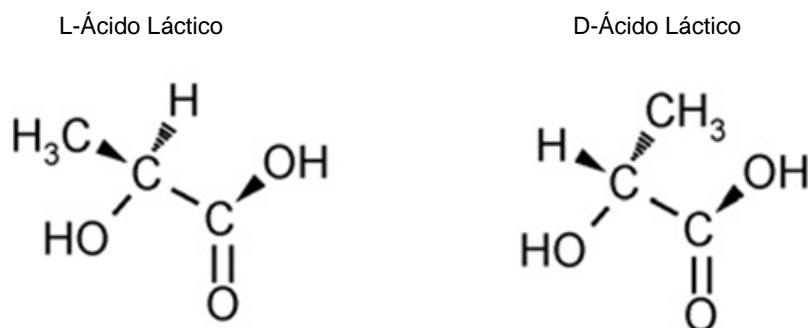


Figura 6. Enantiómeros del ácido láctico.

El ácido láctico se obtiene principalmente de la fermentación de los carbohidratos (glucosa, maltosa y dextrosa) que se realiza por bacterias, tales como las cepas de *Lactobacillus* y también se puede procesar por síntesis química. Para la producción de ácido láctico existen dos clases de bacterias las homofermentativas, que producen ácido láctico casi exclusivamente y las heterofermentativas, que producen subproductos en cantidades apreciables, sin embargo, en la industria se emplean bacterias homofermentativas. El ácido láctico es miscible en agua y etanol y presenta la propiedad de ser higroscópico.<sup>45</sup>

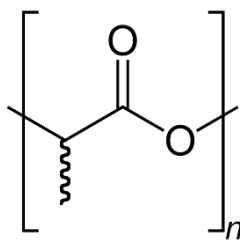


Figura 7. Fórmula química del PLA.<sup>46</sup>

## Lactida

La lactida es un monómero diéster cíclico del ácido láctico, la cual se utiliza para obtener un alto grado de polimerización del PLA. La lactida se obtiene por la despolimerización de un prepolimero de bajo peso molecular de PLA. La despolimerización se realiza con altas temperaturas y presión reducida del prepolímero para obtener lactida, la cual puede tener tres isómeros diferentes: L-lactida, D-lactida y la mezcla racémica o meso-lactida, como se muestra en la Figura 8. La formación de

estos isómeros depende de los isómeros del ácido láctico, de la temperatura y del catalizador.<sup>47</sup>

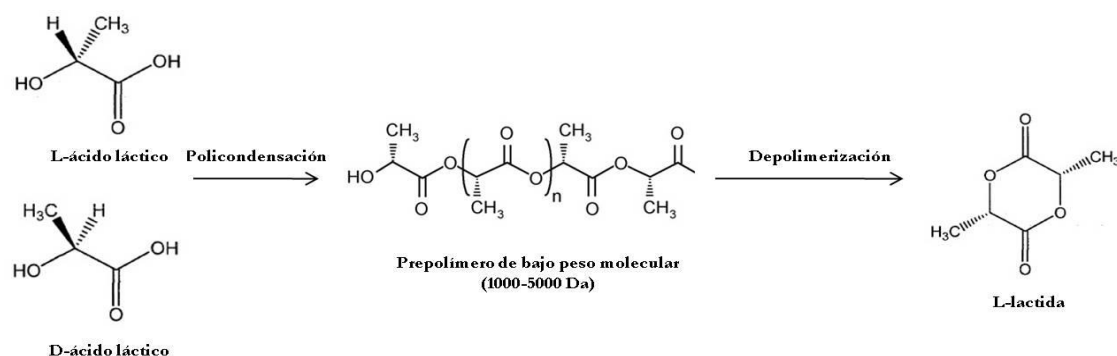


Figura 8. Síntesis de la lactida.<sup>43</sup>

## Síntesis de Poli(ácido láctico)

La polimerización del ácido láctico para obtener poli(ácido láctico), se puede realizar por dos métodos: la policondesación del ácido láctico y la policondesación por apertura de anillo. Con el primer método se obtiene un polímero de PLA con bajo peso molecular, frágil y vidrioso, el cual no es muy útil. Sin embargo, con el segundo método se puede lograr obtener un peso molecular más alto.<sup>48</sup>

La polimerización por condensación directa del PLA se realiza en volumen, con la destilación de agua por condensación con o sin catalizador, mientras la temperatura y el vacío se incrementan progresivamente. Se obtiene un peso molecular bajo, debido a que es difícil eliminar de la reacción, el agua y los restos de catalizador. Sin embargo, actualmente se han utilizados nuevas técnicas para aumentar el peso molecular por la policondesación del PLA, mediante la ruta de descompresión y esterificación.

La polimerización por apertura de anillo (ROP) de la lactida para la formación del PLA es el método que se usa normalmente para comercializarlo. La lactida es producida por la degradación térmica de un ácido oligolactico, este es un monómero fácil de purificar por sublimación al vacío para eliminar agua e impurezas. Posteriormente, la polimerización de la lactida puede ser iniciada con calor y a vacío, por complejos metales, compuestos orgánicos o enzimas, con o sin alcohol y así, obtener un peso molecular alto del PLA.<sup>49</sup>

### **Propiedades del Poli(ácido láctico)**

El PLA es un polímero al cual se le puede modificar la estructura estereoquímica por medio de la polimerización. Esto es debido a que los monómeros que se utilizan para la polimerización presentan quiralidad. De esta forma se puede obtener isómeros del PLA ya sean L o D. Por lo cual, el tipo de composición estereoquímica y el peso molecular del PLA influirán en las propiedades mecánicas y en el grado de cristalización. Pero a su vez, la degradación hidrolítica es afectada por la cristalización.<sup>50</sup> Esto implica que un polímero de PLA cristalino tardara meses o años en hidrolizarse completamente a ácido láctico. Sin embargo, cuando el PLA es amorfo es degradado en unas semanas. El poli(L-ácido láctico) y el poli(D-ácido láctico) son polímeros semicristalinos y la degradación se lleva a cabo en un período entre 18 a 26 meses. Sin embargo, la polimerización de la meso-lactida del PLA (PDLLA) forma un polímero amorfo y se degrada en 12-16 meses. También hay que tomar en consideración que la degradación del PLA depende del peso molecular. Se demostró que a un mayor peso molecular, el PLLA presenta mayor tiempo para la degradación.<sup>51</sup>

El PLA a partir de la L-lactida (PLLA) y D-lactida(PDLA) presentan un temperatura de fusión en un intervalo de 170°C a 180°C y una temperatura de transición vítrea de 60-65°C. Este intervalo se debe a que puede presentar imperfecciones de cristales, impurezas y mínimas ramificaciones. El PLLA y PDLA presentan un módulo de Young alrededor de 2.7 GPa y una resistencia a la tensión de 50 a 70 MPa. Por su parte, el PDLLA que da como resultado un polímero amorfo, presenta una temperatura de transición vítrea de 55-60°C y un módulo de Young de 1.9 GPa.<sup>43,53</sup>

### **Degradación del Poli(ácido láctico)**

En los polímeros la degradación es la ruptura de los enlaces del polímero a través de procesos químicos, físicos o biológicos; si se lleva a cabo en un medio ambiente adecuado, que lleva a la desintegración del polímero.<sup>54</sup>

La degradación del PLA se da por el rompimiento de las cadenas principales del PLA y se puede realizar por degradación química y biológica. El comportamiento y la ruta de la degradación del PLA depende de varios factores, tales como: el peso molecular del polímero, la estructura molecular, el grado de cristalización, así como por la morfología, las dimensiones y porosidad de material. Sin embargo, también influyen agentes externos como la temperatura, el pH, la humedad, la presencia de enzimas y de otros de microbios presentes en el medio.<sup>52</sup>

Principalmente, la degradación del PLA se realiza por hidrolisis, la cual se lleva a cabo en sus grupos éster, que son hidrolizados en presencia de agua y forma ácido láctico.

Los oligómeros son de bajo peso molecular, por lo tanto son digeridos por microorganismos.<sup>55</sup>

## **El Poli(ácido-láctico) en la Ingeniería de Tejidos**

El PLA en la elaboración de andamios ha demostrado ser un polímero importante en la ingeniería de tejidos, por su habilidad para soportar la proliferación y diferenciación de varios tipos de células. Ha sido aprobado por la FDA para varias aplicaciones en el ámbito médico y se utiliza para suturas, ya que es un polímero que se hidroliza y los productos de la degradación no son tóxicos y eventualmente son eliminados por el cuerpo en forma de dióxido de carbono y agua. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que es un polímero hidrófobo. Debido a que es un polímero soluble, facilita la elaboración de andamios en tercera dimensión y con diferentes formas. El PLA es termoplástico y esto lo hace práctico para la fabricación de andamios por distintas técnicas como: extrusión, fases de separación, y electrohilado.<sup>56</sup>

Bajo la técnica del electrohilado se han realizados diferentes andamios de PLA. Uno de ellos, fue electrohilar la solución de PLA disuelto en cloroformo, en donde se obtuvieron fibras con diámetros de  $10.3 \pm 1.3$  micras, con un módulo de 180 MPa. Se demostró que es un buen andamio para crecimiento de células de músculo liso de aorta.<sup>51</sup> Por otra parte, en la literatura se puede encontrar otros trabajos, en donde se modificaron diferentes condiciones para electrohilar el PLA o copolímeros del PLA y posteriormente se utilizaron como andamios para crecimiento celular de diferentes



tejidos. Se muestran en la tabla 1 algunos de los electrohilados de PLA, con las condiciones del proceso, las características de las fibras obtenidas y sus aplicaciones.

**Tabla 1. Andamios electrohilados de PLA**

Polímero	Disolvente /concentración	Diámetro de fibras	Condiciones para electrohilar	Aplicaciones (tipo de células)
Poli(ácido láctico) (2005)	Diclorometano/ Dimetilformamida	150-500 nm 800-3000 nm	Concentración: 1% y 5% Flujo de inyección : 1mL/h Distancia: 10 cm Voltaje: 12 kV	I.T. Neural (Células del cerebelo de ratón) <sup>57</sup>
Poli(L-ácido-láctico) e hidroxiapatita (2007)	Diclorometano 1,4-dioxane	≤500 nm	Concentración Flujo de inyección 1mL/h : Distancia: 10 cm Voltaje: 10 kV	I.T Hueso (Células de osteosarcoma de humano). <sup>58</sup>
Poli(L ácido láctico)/colágena ( 2007)	Hexafluoro-2 propanol	1290 nm	Concentración: 12 % ( 0.83 % colágena) Flujo de inyección: 5 mL/h : Distancia: 11.5 cm Voltaje:18 kV	I.T Hueso (preosteoblastos) <sup>59</sup>
Poli(L-ácido láctico)/colágena tipo I/ BMP-2 (2011)	Diclorometano Hexafluoro-2 propanol Ácido acético	217 nm	Concentración: 4 % p/p Flujo de inyección: 14 uL/min : Distancia: 15 cm Voltaje: 10-18 kV	I:T Hueso (células troncales mesénquimales). <sup>60</sup>
Poli(L-ácido láctico)/gelatina y poli(D-ácido láctico) (2012)	Dochlorometano Tetraflurano Dimetilformamida	----	Concentración: PLA al 7%, y PDLA al 22% Flujo de inyección: 5 mL/h Distancia: 15 y 5 cm Voltaje: 12 y 18 kV	I.T Hueso (propiedades de las fibras). <sup>61</sup>
Poli(L-ácido láctico) (2012)	Cloroformo- Dimetilformamida	----	Concentración: 4% Flujo de inyección: 4 mL/h Distancia: 30 cm Voltaje: 22 kV	Obtener fibras alineadas <sup>62</sup>
Poli(L ácido láctico) co-poli(caprolactona) colàgena I/colàgena III (2012)	Hexafluoro 2 propanol	253 nm	Concentración: 13% y 10% Flujo de inyección: 1mL/h Distancia: 11 cm Voltaje: 12 kV	I.T Nervioso (células troncales nerviosas). <sup>7</sup>
Poli(ácido láctico) (2013)	Dicloruro de metileno	3-7 micras	Concentración: 12%: Distancia: 15 cm Voltaje: 12 kV	Obtener fibras porosas. <sup>63</sup>
Poli(L-ácido láctico)/ poli(etilen glicol)	Diclorometano Dimetilformamida	500-1300 nm	Concentración: 3.8-5 % Flujo de inyección: 0.6-14 mL/h Distancia: 18 cm Voltaje: 15 kV	I.T (fibroblastos de ratón). <sup>64</sup>

## Electrohilado

El electrohilado es un proceso patentado por Formhals en 1934. Esta técnica se utiliza para producir finos filamentos de polímeros. El electrohilado se ha empleado en diferentes campos, desde la industria textil, y la farmacéutica, hasta la ingeniería de tejidos. En la ingeniería de tejidos se utiliza para la elaboración de andamios, debido a que es un proceso único, versátil y apropiado para la fabricación de fibras que se encuentran en el intervalo del tamaño de la matriz extracelular. Las fibras con tamaños pequeños proporcionan una mayor área superficial, que permite controlar la geometría del poro de los andamios. El electrohilado es ampliamente usado por la facilidad de fabricar fibras de diferentes polímeros, tanto sintéticos como naturales.<sup>25, 65</sup>

De esta manera, el electrohilado crea micro o nano fibras a partir de una solución polimérica, a la cual se le aplica un diferencial de voltaje. El equipo se compone principalmente de una fuente de voltaje de un intervalo de 0-30 kV, con dos electrodos. Un electrodo es conectado al capilar (aguja) de una jeringa, la cual contiene la solución polimérica. La velocidad de inyección de la solución polimérica se encuentra controlada por una bomba de inyección y, finalmente, en el colector (placa de metal), se depositan las fibras, en el cual se conecta el otro electrodo. El colector puede ser estático o dinámico y se puede ubicar a diferentes distancias, de 10- 45 cm, a partir de la salida del capilar hacia el colector (Figura 9).<sup>66</sup>

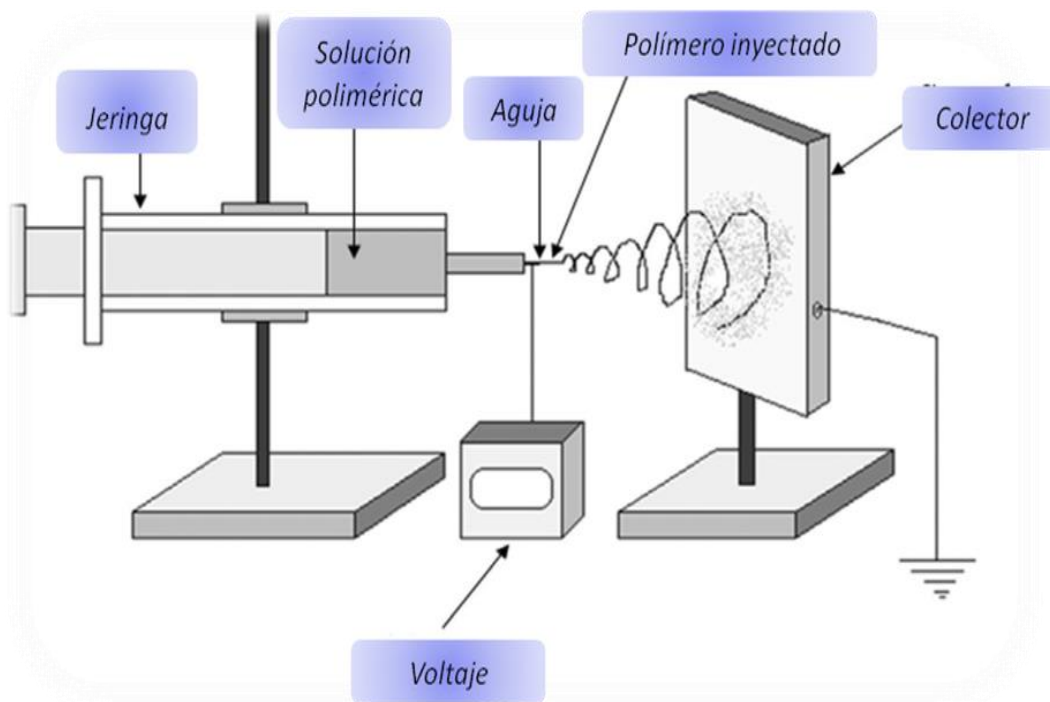


Figura 9. Sistema del electrohilado.

La teoría del funcionamiento del electrohilado consiste en la aplicación de un potencial eléctrico alto a una gota colgante de una solución polimérica, para formar un filamento fino. Específicamente, se aplica un voltaje a la aguja de la jeringa cargada de polímero, dirigido a un colector conductor que sirve como contraelectrodo. La resultante del campo eléctrico externo aplicado produce un esfuerzo en dirección tangencial sobre la solución del polímero. Esto causa la deformación de la gota (cono de Taylor). Cuando la tensión superficial de la solución polimérica es superada por el campo eléctrico, permite la formación de un chorro de la solución. Durante la trayectoria de los chorros de la solución desde la jeringa hacia el colector, el disolvente se evapora y se depositan las fibras sobre el colector.<sup>67,68</sup>

Para poder obtener andamios con fibras con una determinada morfología y el porcentaje de espacio libre deseado, es necesario controlar varios parámetros: los parámetros de la solución del polímero, del proceso del electrohilado y los factores ambientales.<sup>10</sup>

- a) Los parámetros de la solución involucran; peso molecular del polímero, concentración del polímero, viscosidad de la solución, conductividad de la solución y la tensión superficial de la solución. Estos parámetros influyen en la formación de defectos en las fibras, como las denominadas cuentas, y en el diámetro de las fibras.<sup>69</sup>
- b) Los parámetros del proceso del electrohilado son: el voltaje aplicado, la velocidad con que se inyecta la solución polimérica, el tipo de colector, el diámetro de la aguja y la distancia de la salida de la aguja hacia el colector. Estos parámetros tienen cierta influencia en la morfología de las fibras.<sup>68</sup>
- c) Los parámetros ambientales: humedad, tipo de atmosfera y presión. Se ha demostrado que estas condiciones están involucrados en la formación de poros sobre las fibras.<sup>70</sup>

## CAPÍTULO II: TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

### Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) surge por la necesidad de observar especímenes a mayor resolución, lo cual no era posible de resolver con la longitud de onda de la luz visible (centenares de nm). Esta microscopía utiliza electrones acelerados con una longitud de onda de 2800 nm menor que la luz, y así, se puede obtener mayor resolución en la imagen de la muestra.<sup>71</sup>

El funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido consiste en que un haz de electrones, con un diámetro que es disminuido por una lente condensadora y objetiva, hasta 4 nm y 200 nm. Este haz de electrones es enfocado sobre la superficie del espécimen para realizar un barrido del área de interés, por lo cual, se generan varios tipos de señales (electrones secundarios, retrodispersados, Auger, Rayos X característicos, y catodoluminiscencia). Estas señales son recolectadas por un detector específico para cada señal y procesado para formar una imagen, la señal de la muestra es mostrada en la pantalla del monitor como una imagen. Principalmente la información que proporciona la SEM de una muestra es su morfología, topografía y homogeneidad química.<sup>72</sup>

Las partes esenciales que conforman un microscopio electrónico de barrido se muestran en la siguiente imagen (Figura 10).<sup>73</sup>

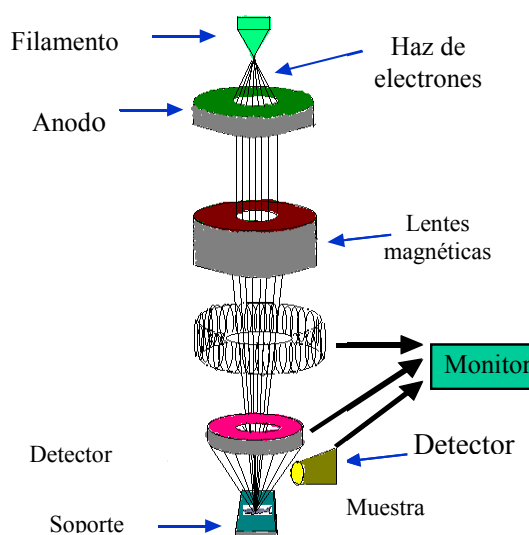


Figura 10. Microscopio electrónico de barrido. <sup>73</sup>

## Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X

La caracterización por espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDS) utiliza los rayos-X característicos provenientes de una muestra cuando ésta es bombardeada por el haz de electrones primario. Esta técnica de caracterización se realiza habitualmente mediante un detector de rayos X acoplado a un microscopio electrónico, el cual nos permite identificar y cuantificar los porcentajes atómicos de los elementos presentes en una muestra. Un detector de estado sólido produce, por cada fotón incidente, un pulso de voltaje proporcional a su energía. Los pulsos son clasificados y contados por dispositivos electrónicos que finalmente generan el resultado de la cuantificación. Ya que cada elemento emite rayos X con una energía característica, es posible identificar la composición elemental de una muestra.<sup>74</sup>

Cuando un haz de electrones interactúa, los electrones de las capas internas de los átomos de cada elemento salen de la muestra y generan vacancias, en esta condición

el átomo está ionizado y así se mantiene cierto tiempo. Posteriormente, el átomo regresa a su estado fundamental mediante transiciones electrónicas de las capas externas a las vacancias. Estas transiciones electrónicas se presentan como energía liberada en forma de fotones en el espectro de rayos-X y que corresponden a transiciones entre capas internas denominados rayos-X característicos.<sup>75</sup> Los diferentes niveles energéticos para cada material están perfectamente identificados. Las transiciones electrónicas entre las diferentes capas son propias de cada elemento, ya que dos electrones en un átomo no pueden tener el mismo conjunto de números cuánticos y por tanto la misma energía. Con base en esto, es posible identificar perfectamente de donde proviene la energía de los rayos-X característicos y saber el tipo de elementos que tiene una muestra en particular.

El resultado de la cuantificación es desplegado en un espectro de dispersión de energía en forma de histograma, donde el eje vertical representa el número de cuentas o la intensidad y el eje horizontal la energía del fotón de rayos-X emitido en KeV. Una limitante de la técnica en el análisis químico elemental al usar rayos-X se presenta para elementos ligeros cuya radiación se caracteriza por tener una longitud de onda larga. La razón es que para estos elementos los rayos-X son fácilmente absorbidos y difícilmente son difractados, además de presentar dificultades para que el detector pueda hacer una correcta recepción de estas longitudes de onda largas.<sup>70</sup>

## Espectroscopia Infrarroja

La espectroscopia infrarroja (IR) es una técnica analítica que puede ser usada para identificar materiales, determinar la composición de mezclas, monitorear el curso y grado de la reacción, y proveer información útil para deducir la estructura molecular. La radiación infrarroja es un tipo de radiación electromagnética de mayor longitud de onda que la luz visible, pero menor que la de las microondas. La región infrarroja del espectro comprende radiación a un número de onda desde 12 800 a  $10\text{ cm}^{-1}$ . Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como del instrumento, es conveniente dividir el espectro infrarrojo en tres regiones: infrarrojo cercano, medio y lejano.<sup>76</sup>

El estudio de la espectroscopia infrarroja provee información de vibraciones moleculares específicas de una muestra. Por lo tanto, es la interacción de la materia con un haz de energía en el intervalo del espectro infrarrojo medio, que se encuentra en una longitud de onda de  $4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ . Cuando el haz infrarrojo se hace pasar a través de la muestra, se puede absorber o transmitir la radiación todo depende de la frecuencia y de la estructura de la muestra. Una molécula de la muestra absorberá la energía de un haz de la luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria, para que se dé una transición de vibración de la molécula. Es decir, los enlaces de la molécula comienzan a vibrar de una manera determinada debido a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja. Como se sabe, una molécula puede presentar los tres tipos de movimiento: traslación, rotación y vibración. Por lo tanto, se puede distinguir dos categorías básicas de vibraciones de la muestra incidida por el infrarrojo que son: vibración *de estiramiento* y *de flexión*.<sup>77</sup> En una vibración de estiramiento hay cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del



enlace entre dos átomos. Estas vibraciones también pueden darse de forma simétrica y asimétrica. Las vibraciones de flexión son debido a un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: de tijereteo, de balanceo, de aleteo y de torsión (Figura 11). Con las vibraciones del espécimen se obtienen un espectro, en donde se localizan bandas que indican aquellas vibraciones junto con transiciones rotacionales. Por lo tanto, el espectro de IR consta de estas series de bandas que son presentadas en una gráfica, donde la información se reporta en el eje x como la longitud de onda y en el eje y la intensidad de absorción o porcentaje de transmitancia.<sup>78</sup>

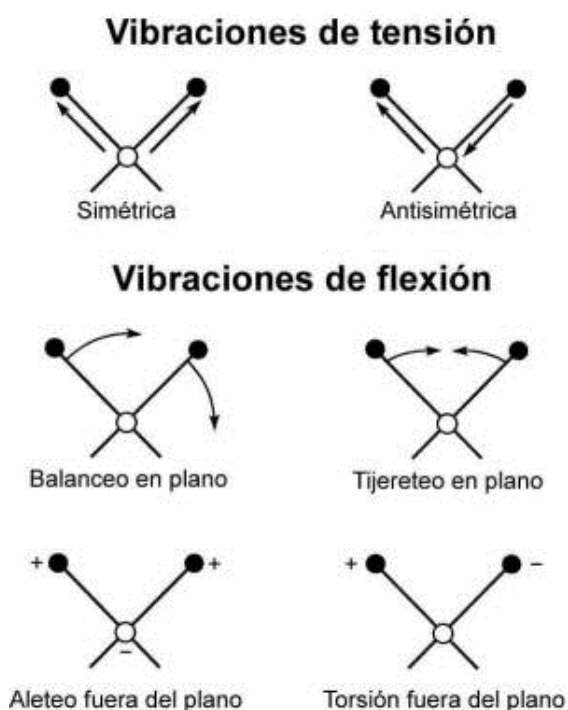


Figura 11. Movimientos de vibración de una molécula.<sup>79</sup>

Hay tres tipos de instrumentos para la medición de absorción en el infrarrojo: espectrofotómetros dispersivos con monocromador de red, espectrómetros por transformada de Fourier con interferómetro y fotómetros no dispersos equipados con un filtro o gas absorbente. A continuación se hará la descripción de un espectrómetro por transformada de Fourier (el más común), el cual consta de tres elementos básicos: una fuente luminosa, un interferómetro de Michelson y un detector (Figura 12). Su funcionamiento es el siguiente: un haz colimado, proveniente de una fuente que emiten la región infrarroja. El interferómetro modula la división del haz de luz en dos caminos, para que un rayo golpee a un espejo fijo y el otro a un espejo móvil. Los haces se reflejan para rebotar y se recombinan al llegar al divisor de haz. El haz resultante pasa a través de la muestra, en donde sucede una absorción selectiva de longitudes de onda y, finalmente, llega al detector.<sup>80</sup>

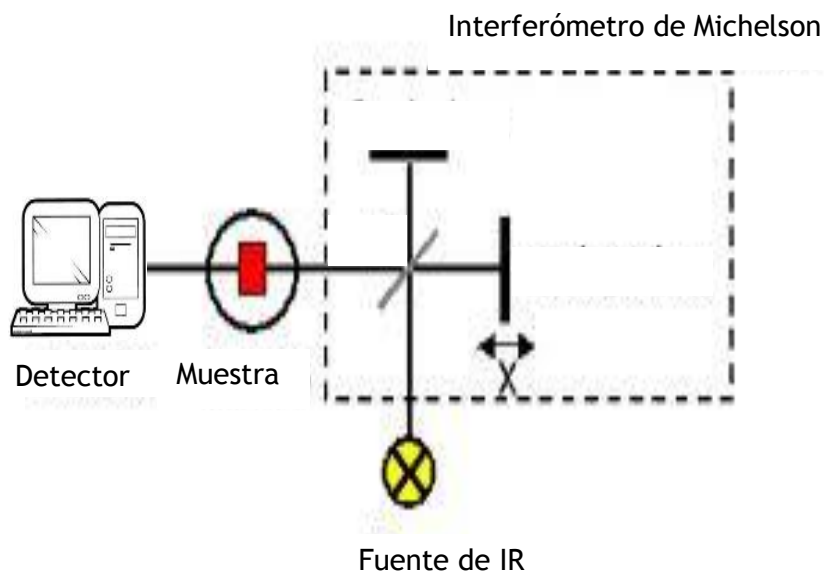


Figura 12. Interferómetro de Michelson

## CAPÍTULO III: DISEÑO EXPERIMENTAL

### Planteamiento del Problema

La pérdida de tejido de la dentina y la falta de la autoregeneración en su totalidad, es un problema para la salud dental. Para dar solución a ello, se ha investigado la generación de la dentina mediante la ingeniería de tejidos, de tal forma que esta interdisciplina busca por medio de células troncales, moléculas bioactivas y andamios realizar la regeneración de este tejido.

Sin embargo, aún se encuentra en investigaciones el andamio ideal para la regeneración de la dentina. De esta manera, se busca obtener los parámetros óptimos para elaborar andamios electrohilados de PLA con colágena de dentina de bovino, que cumplan con los valores adecuados de resistencia a la tensión, porosidad y con diámetros de fibras de 50 a 500 nm.

### Justificación

La caries dental es una enfermedad que se caracteriza por la destrucción de tejidos duros dentarios, hasta poder llegar a la pérdida de piezas dentales. Si es tratada a tiempo se puede evitar dichos problemas, ya sea con rehabilitación dental o en su caso el tratamiento endodóncico, cuando se ve afectado el tejido pulpar. Uno de los retos en la odontología al restaurar piezas dentales es dar una restauración adecuada, con materiales que posean propiedades físicas y químicas similares al tejido dental. Sin embargo, los materiales dentales aún no logran todas aquellas propiedades que

necesita una pieza dental, debido a que estos materiales están sujetos a erosiones, degradación y problemas en la interface del tejido sano y el material de relleno.<sup>(81)</sup>

La ingeniería de tejidos, en el área odontológica busca la regeneración del tejido pulpar y de la dentina, para lograrlo bajo esta interdisciplina, es necesario empezar por obtener andamios con propiedades que favorezcan la adhesión, la proliferación y la diferenciación de células pluripotenciales para la regeneración de los tejidos dentales. Se ha demostrado que la forma y la composición de los andamios son importantes para la proliferación y diferenciación de las células troncales de origen pulpar.<sup>82</sup> En este trabajo se buscó elaborar un andamio con un polímero sintético (PLA), que esté aprobado por la FDA y que provee propiedades mecánicas para dar soporte a las células,<sup>3</sup> y un polímero natural, que es la colágena, la cual ayuda a la adhesión y proliferación de células y es un material que se utiliza para curar heridas orales.<sup>83</sup> Si la colágena se obtiene a partir de la de dentina de bovino, puede tener características similares a la dentina de los órganos dentales humanos y como también presentar la colágena, tipo I, característica de la dentina. Los andamios se obtendrán por el proceso del electrohilado, ya que se ha demostrado que por medio de esta técnica se puede controlar el diámetro de la fibra de los andamios hasta obtener diámetros de fibras nanométricas. Cabe destacar que aún no se reporta en la literatura la elaboración de andamios con colágena de dentina de bovino y PLA por la técnica del electrohilado. Se espera que estos novedosos andamios tengan un uso potencial para la regeneración de la dentina humana.

## Objetivos

### Objetivo General

Obtener andamios de PLA mezclado con colágena extraída de dentina de bovino, para comparar el efecto de esta colágena en las propiedades mecánicas, en la morfología y en la porosidad de los andamios electrohilados.

### Objetivos Específicos

- ⦿ Desarrollar un método adecuado para obtener colágena de dentina de bovino con ácido clorhídrico a 0.6 M.
- ⦿ Caracterizar la colágena obtenida por medio de espectroscopia infrarroja y por calorimetría diferencial de barrido.
- ⦿ Elaborar andamios por la técnica de electrohilado con una mezcla de poli(ácido láctico) y de colágena de dentina de bovino obtenida en este trabajo.
- ⦿ Determinar el diámetro y la forma de las fibras y el área porosa de los andamios por medio de microscopía electrónica de barrido.
- ⦿ Conocer las propiedades mecánicas (módulo elástico y resistencia a la tensión) mediante pruebas de tensión uniaxial de los andamios.

## CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales y Reactivos

#### Para la Obtención de Colágena de Dentina de Bovino (CoD)

- a) Dientes inferiores (incisivos) de origen bovino del rastro municipal de San Martín Texmelucan, Puebla, México.
- b) Ácido clorhídrico (HCl), grado reactivo ACS, al 37% Sigma Aldrich.
- c) Agua desionizada.
- d) Colágena de piel de becerro, Elastin Products Company, Inc.

#### Para Elaborar Andamios Electrohilados de PLA con CoD

- a) Poli(ácido láctico) de Naturewoks.
- b) Colágena de dentina de bovino.
- c) Trifluoroetanol (TFE) Sigma Aldrich.
- d) Ácido acético con pureza de 99%.(AC)
- e) Agua desionizada.

## Desarrollo Experimental

### Método para Obtener Colágena de Dentina de Bovino

Para extraer la colágena a partir de la dentina de bovino fue necesario recolectar las piezas dentales de los bovinos en el rastro municipal de San Martín Texmelucan. Se realizó la extracción de los dientes anteriores inferiores, los cuales se lavaron con agua desionizada, se les retiró con una cureta el cemento y tejido periodontal de la raíz. Posteriormente, se eliminó mecánicamente la pulpa cameral y radicular, por lo cual, para realizar este paso y poder entrar al tejido pulpar, fue necesario efectuar un corte horizontal a nivel del cuello del diente y así se retiró toda la corona dental e incluso el esmalte. De esta manera solamente se trabajó con la dentina de la raíz del diente. Subsecuentemente se almacenaron las raíces en refrigeración en agua desionizada a 4°C, conforme a las indicaciones de la norma ISO/TS 11405 (2003).(84) Finalmente, con las raíces limpias, se realizó una molienda en un molino planetario de bolas PM100. Se obtuvo una molienda final de dentina, que se usó para realizar el proceso para obtener la colágena.

El tejido óseo de bovino se encuentra compuesto por un 65% en peso de materia inorgánica, un 25% en peso de materia orgánica y el 10% restante es agua. Por su parte, la dentina se encuentra constituida por materia inorgánica en un 70% en peso, la orgánica corresponde al 20 % (principalmente colágena) y el 10% es agua.(31) Por ser ambos tejidos muy parecidos, se decidió que el método adecuado para extraer colágena a partir de la dentina de bovino, fue basándonos en la técnica de Longin con modificaciones en el tiempo de la desmineralización. El método de Longin se desarrolló

básicamente para la extracción de colágena de huesos arqueológicos. Las muestras de hueso (100 mg en polvo) son descalcificadas en 10 mL de una solución de 0.6 molar de ácido clorhídrico a 4°C por 1 hora. Este tratamiento es repetido en tres ocasiones y entre cada paso, la fracción orgánica es separada de la inorgánica por medio de centrifugación a 6000 g. Posteriormente, los residuos son neutralizados con agua.<sup>85</sup>

El método de Longin se modificó en este trabajo para lograr la obtención de colágena de dentina de bovino y fueron prácticamente los siguientes pasos: por cada 100 mg de la molienda de dentina con un tamaño de partícula menor a 27  $\mu\text{m}$ , se le realizó un lavado en 10 mL con ácido clorhídrico al 0.6 molar por 24 horas y, posteriormente, se centrifugó a 8000 rpm por 10 min a 4°C. Después de llevar a cabo la centrifugación nuevamente se realizaron otros dos lavados con este ácido en las mismas condiciones y entre cada lavado se centrifugó a 8000 rpm por 10 min. Después de efectuar el último lavado, se realizaron otros tres lavados, subsecuentes, con agua desionizada y centrifugación a las mismas revoluciones por minuto anteriormente mencionadas para, finalmente, tener compactada la colágena en el tubo de centrifugación. Esta colágena obtenida se liofilizó durante 24 horas y luego se caracterizó por SEM, FT-IR, EDS, DSC y TGA (Figura 13).

Cabe mencionar que se caracterizó la materia prima (la molienda de dentina) por medio de espectroscopia infrarroja y espectroscopia por dispersión de rayos X (EDS).



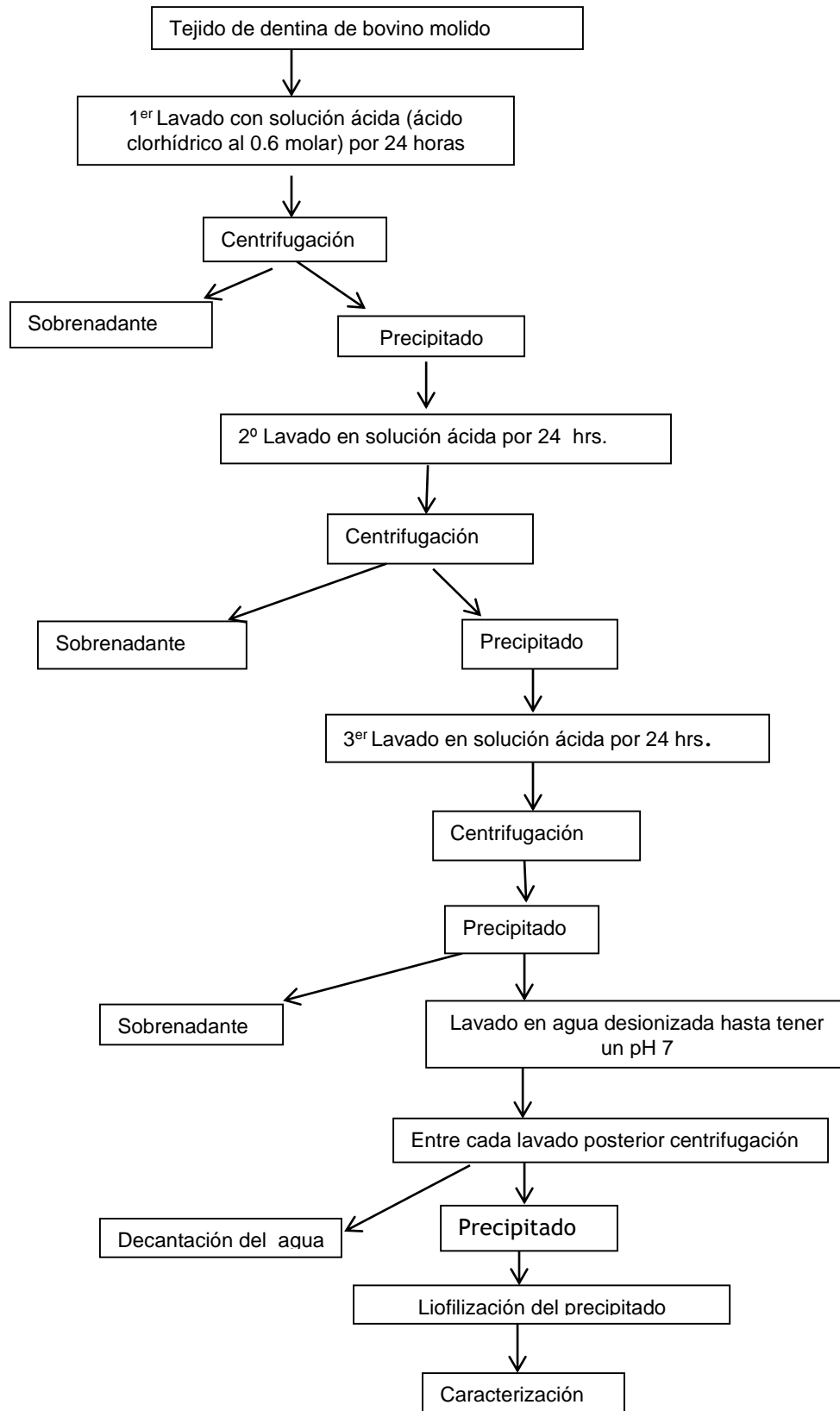


Figura 13. Método de obtención de colágena de dentina de bovino.

## Método para Obtener Andamios Electrohilados de PLA y PLA: CoD

### Preparación de Soluciones de PLA y PLA: CoD

Las soluciones de PLA se prepararon al 13 y 16 % p/v en un matraz volumétrico de 2 mL, se utilizaron dos sistemas de disolventes: uno con trifluoroetanol y el otro con trifluoroetanol en combinación con ácido acético. Las soluciones se dejaron en agitación por 24 horas, para posteriormente ser utilizadas para electrohilar.

Por otra parte, las soluciones de PLA con colágena de dentina de bovino (CoD) se realizaron en una relación de 30:1 y 15:1 (en una proporción en peso). Las soluciones se prepararon al 13 y 16% p/v respecto al PLA. Se utilizaron los dos sistemas de disolventes: trifluoroetanol y combinación de trifluoroetanol con ácido acético. Todas las soluciones se resumen en la tabla 2.

**Tabla 2. Soluciones para preparar los andamios.**

SOLUCIÓN	TRIFLUOROETANOL: ÁCIDO ACÉTICO (proporción en volumen)		CLAVE
13% PLA	100	0	F13
	99	1	FA13
16% PLA	100	0	F16
	99	1	FA16
13% PLA: CoD 30:1	100	0	CF13
16% PLA: CoD 30:1	100	0	CF16
	99	1	CFA16
16% PLA: CoD 15:1	100	0	C5F16
	99	1	C5TFA16

## **Método para Obtener Andamios Electrohilados de PLA y PLA: CoD**

Para elaborar los andamios, las soluciones de PLA y PLA con CoD se procesaron en el equipo del electrohilado. Bajo este proceso, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: voltaje (kV), velocidad de inyección (mL/hr), diámetro de la aguja (mm), volumen total de la solución electrohilada (mL) y la distancia entre la aguja y el colector (cm). El proceso del electrohilado se realizó de la siguiente manera:

1. La solución polimérica se colocó en una jeringa de plástico con una capacidad de 5 mL y con una aguja de un diámetro de 0.8. La jeringa se posicionó en la bomba de inyección. Con la bomba de inyección se programó el flujo y el volumen de la inyección que se desea de la solución polimérica.
2. Posteriormente se midió la distancia a partir de la salida de la solución polimérica de la aguja hasta el lugar donde se coloca el colector.
3. Se utilizó como colector una placa de aluminio de 10 cm por 10 cm y con un grosor de 4 milésimas.
4. Se colocó un electrodo en la aguja y el otro al colector.
5. Se encendió la fuente de voltaje, se programó el voltaje requerido para electrohilar y se inició la inyección polimérica.
6. Finalmente, una vez depositado el andamio en la placa de aluminio, se retiró el colector de la base y se almacenó en un desecador hasta su caracterización.

## **Parámetros para Electrohilar PLA y PLA:CoD**

La técnica del electrohilado involucra varios parámetros que se tienen que controlar para lograr obtener andamios. Por estas circunstancias se dio a la tarea de buscar los

parámetros más adecuados, por lo cual se varió en el tipo de disolvente, el voltaje aplicado, la distancia de la aguja al colector, y la concentración de la solución polimérica, todo esto con el fin de poder formar andamios con fibras de tamaño nanométrico, para imitar el tamaño de las fibras de colágena de la matriz extracelular. Sin embargo, se inició con los parámetros reportados en un trabajo de PLA con colágena de piel de becerro y posteriormente se fueron modificaron.<sup>86</sup>

En la tabla 3 se presentan las condiciones que se utilizaron para electrohilar el PLA y PLA:CoD.

**Tabla 3. Parámetros para electrohilar.**

Solución	Voltaje	Distancia	Flujo	Diámetro de la aguja	Volumen
F13 ,FA13, F16, FA16, CF13, CF16, CFA16 , C5F16, C5TA16	10 ,13 y 20 kV	10, 15, 25 cm	0.4 mL	0.80 mm	1 mL

## **Técnicas de Caracterización de CoD**

### **Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier**

Las bandas características de la molécula de la colágena fueron detectadas por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier por reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), en el equipo Thermo Scientific Nicolet 6700, en un espectro de un intervalo de  $4000\text{ cm}^{-1}$  -  $400\text{ cm}^{-1}$ .

### **Microscopía Electrónica de Barrido**

Los estudios por microscopía electrónica de barrido se llevaron a cabo en un microscopio de emisión de campo JEOL JSM 7600F, para observar la morfología y homogeneidad de la composición de la muestra de CoD. Se colocó la colágena en un porta muestra cilíndrico y fue necesario recubrirla con una película de oro mediante la pulverización catódica asistida por plasma, para ser observada en el equipo, debido a que la muestra no es conductora.

### **Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)**

La técnica se utiliza para determinar los elementos presentes en una muestra. En este caso se empleó para corroborar la ausencia de los elementos Ca y P que conforman la hidroxiapatita (materia inorgánica) de la dentina, porque a partir de este tejido se extrajo la colágena. La muestra se colocó en un porta muestra de cobre y no se le realizó ningún recubrimiento de oro a la muestra. El equipo para realizar el análisis

fue con un detector de rayos X acoplado a un microscopio electrónico de barrido, anteriormente mencionado.

### **Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

La temperatura de desnaturalización de la colágena de dentina de bovino se evaluó con la técnica de DSC, en el equipo *TA Instruments DSC Q100*. EL estudio de la muestra se realizó sobre una charola de aluminio para DSC, se utilizó una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, en un intervalo de temperatura de 0 °C hasta los 250 °C y en una atmosfera de nitrógeno. El termograma fue analizado por el software *TA Universal Analysis*.

### **Análisis Termogavimétrico (TGA)**

El TGA se realizó para determinar la pérdida de masa de la CoD en función de la temperatura, para observar su proceso de descomposición. Se realizó el estudio en un equipo *TGA Q500*, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, a partir de una temperatura ambiente hasta 600 °C, en una atmosfera de nitrógeno. El termograma fue analizado por el software *TA Universal Analysis*.

## Técnicas de Caracterización de los Andamios de PLA y PLA: CoD

### Microscopía Electrónica de Barrido

Los andamios electrohilados de PLA y PLA:CoD fueron observados por microscopía electrónica de barrido, para analizar la morfología de las fibras y la porosidad de estos andamios. Se seleccionó una parte de la muestra del andamio de 5 mm de ancho por 6 mm de largo. Posteriormente se colocó en un porta muestra cilíndrico y después se le depositó una película de oro, mediante la técnica de pulverización catódica asistida por plasma, para ser observada posteriormente en SEM por electrones retrodispersados.

Para obtener la medición del diámetro promedio de las fibras de cada andamio fue necesario utilizar el programa *image J* (*National Institutes of Health, USA*). Con este programa en micrografía a 2000 aumentos con una área de 2700 micras, se llevaron a cabo 30 mediciones de los diámetros de las fibras de los andamios, Después de realizar las mediciones, se obtuvo el promedio y la desviación estándar de los diámetros de las fibras.

La porosidad relativa o espacio libre se calculó con el programa *image J*. Se midió el espacio libre por medio de contrastes de colores sobre las micrografías de los andamios (el área total de la micrografía fue de 1350 micras). En la imagen de la micrografía se realizó la medición del área del espacio libre de la red de fibras que se encuentran en el primer plano de la micrografía. Las micrografías empleadas para realizar esta medición fueron tomadas a 2000 ampliaciones.

### **Ensayo en Tensión**

Los andamios fueron caracterizados mecánicamente en un ensayo de tensión uniaxial, se empleó un máquina de pruebas mecánicas universal marca Instron, modelo 5500R, equipada con una celda de carga de 50 N. Las pruebas se realizaron a una temperatura de 24 °C y a una velocidad de deformación de 10 mm/min. Para realizar esta prueba, fue necesario elaborar andamios de un grosor de 0.2 mm. Las probetas ensayadas fueron cortadas con un suaje especial, cuyas dimensiones se encuentran específicas en la norma ASTM D1708-96.<sup>87</sup> Esta norma se emplea para determinar las propiedades de resistencia a la tensión de materiales plásticos de películas de hasta un grosor menor de 1 mm. Se ensayaron 5 muestras de cada material (PLA, PLA:CoD) y se obtuvo la resistencia en tensión y el módulo elástico promedio.

### **Ángulo de Contacto**

Se ha demostrado, en la ingeniería de tejidos, que los andamios con propiedades hidrofílicas pueden favorecer el crecimiento y la adhesión celular.<sup>88</sup> De esta manera para determinar la naturaleza hidrofílica o hidrofóbica de los andamios de PLA y PLA:CoD, fue necesario realizarles la medición del ángulo de contacto de estos andamios. La prueba del ángulo de contacto se realizó en un goniómetro de la marca Ramé-hart, inc modelo 100-07- 00, el cual se encuentra acoplado a un sistema óptico. Para medir el ángulo de contacto, una gota de agua desionizada con un volumen de 16 µl se depositó sobre la superficie de la muestra del andamio, el cual estaba colocado sobre el colector (placa de aluminio). La imagen de la gota fue captada por una cámara de



video durante un tiempo de 3 min. El ángulo de contacto se midió al segundo 2, 90, y 180 para observar si con el tiempo llegara a presentar alguna disminución. En esta prueba se ensayaron 3 muestras de 1.5 cm x 1.5 cm, para cada condición del andamio y se realizaron 5 mediciones en diferentes puntos de cada muestra. Las mediciones se realizaron con el programa *image J*®. Con este programa se puede procesar imágenes digitales y realizar la medición de ángulo de contacto.

## CAPÍTULO V: RESULTADOS

### Caracterización de la Dentina de Bovino

En la espectroscopia infrarroja de la dentina de bovino se detectaron las bandas representativas del agua, de la materia inorgánica y de la orgánica. Las vibraciones asociadas a la molécula del agua se detectaron en el número de onda  $\text{cm}^{-1}$  de 3323 y  $1660 \text{ cm}^{-1}$ . Esta última banda es poco intensa, debido a que se traslapa con la banda de la materia orgánica.<sup>89</sup>

El material inorgánico está compuesto principalmente de carbonatos de hidroxiapatita. Estos componentes se observan en el infrarrojo en la región del hidroxilo, de carbonatos y de radicales de fosfatos. De esta manera, las bandas de los radicales de fosfatos se encuentran en  $1016, 600, 560$  y  $470 \text{ cm}^{-1}$ . La banda que corresponde al grupo hidroxilo se detectó en  $752 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 14 a).<sup>90</sup> Finalmente, la materia inorgánica se observó en el intervalo de  $1644$  y  $1201 \text{ cm}^{-1}$ . Solo se indicaron las bandas más importantes de la colágena que corresponde a: la amida I en  $1644 \text{ cm}^{-1}$ , amida II  $1539, 1451 \text{ cm}^{-1}$  y amida III  $1238 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 14 b).<sup>89</sup>

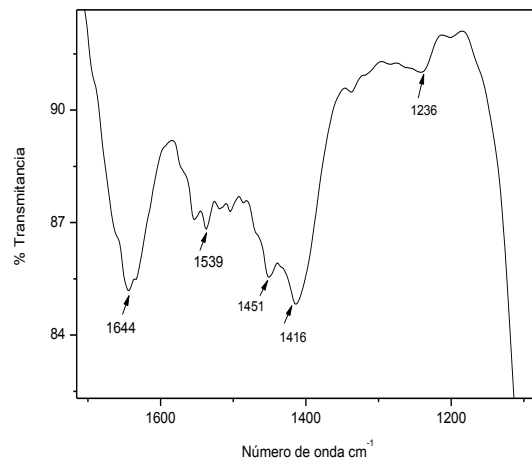
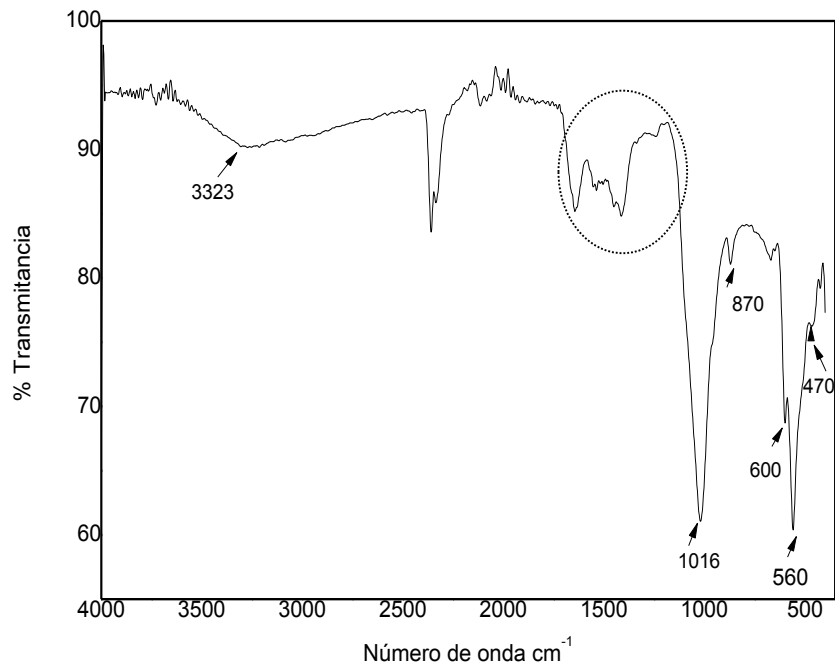
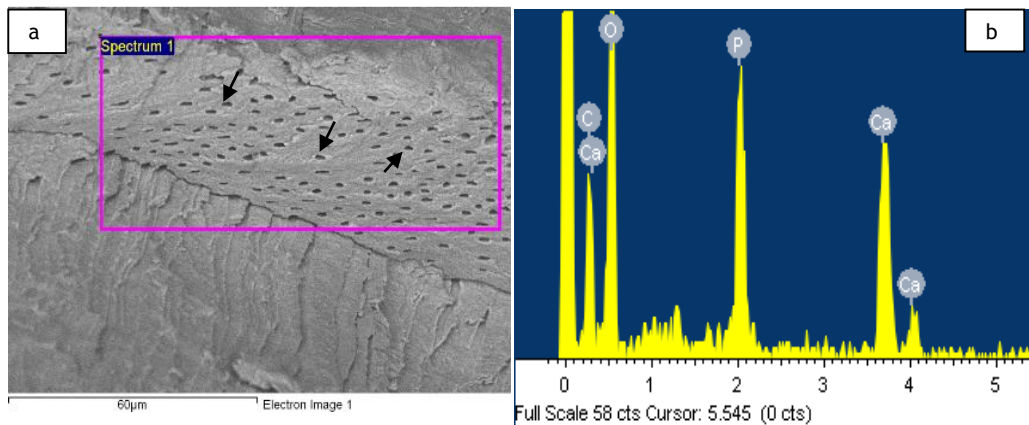


Figura 14. a) Espectro de la dentina de origen de bovino. Se observan las bandas características de la dentina, basándonos en la descripción de Luciano Bachmann y colaboradores.<sup>89</sup> b) Amplificación del espectro de dentina de bovino en la zona de las bandas que corresponde al material orgánico.

Se realizó un EDS a la dentina de bovino para determinar los elementos que se encuentran presentes en este tejido. El análisis se realizó en una zona de la dentina como se observa en la Figura 15 a. Los resultados del espectro de este análisis elemental indican la presencia del O, Ca, P y C (Figura 15 b). Estos elementos son característicos de la materia inorgánica de la dentina humana, como se menciona en la literatura.<sup>91</sup>



c)

Elemento	% en peso	% atómico
C	13.68	21.75
O	49.43	58.97
P	12.26	7.56
Ca	24.63	11.73
Total	100%	100%

Figura 15. Espectroscopia por dispersión de energía de rayos X de la dentina de bovino. a) Micrografía de la dentina de bovino a una amplificación de 1000 X, donde se observan los túbulos dentinarios (flecha) y en el recuadro rosa, se enmarca la zona donde se realizó el análisis de elementos. b) Espectro del análisis de la dentina. c) Tabla de los resultados de los elementos que se encuentran presentes en la dentina.

## Obtención de CoD

El método de Longin modificado, el cual se mencionó en los párrafos anteriores, fue efectivo para obtener colágena de dentina, la muestra después de ser liofilizada se observó con una consistencia esponjosa blanca. Se logró obtener un rendimiento de colágena de 9 mg a partir de 100 miligramos de molienda de dentina.

## Resultados de la Caracterización de la CoD.

### Espectroscopia Infrarroja

En la Figura 16 se muestra el espectro infrarrojo de la CoD liofilizada, en donde se pueden detectar las bandas más representativas de los grupos funciones de la colágena, de acuerdo con el estudio de F. Maspero y colaboradores quienes obtuvieron colágena a partir de hueso de bovino.<sup>92</sup> Ellos mencionan que la banda de vibración en el número de onda de  $3300\text{ cm}^{-1}$  se asocia a la amida A, en  $1631\text{ cm}^{-1}$  a la amida I, en  $1539\text{ cm}^{-1}$  a la amida II y en  $1234\text{ cm}^{-1}$  a la amida III, que corresponde a las vibraciones de los grupos funcionales de la colágena representados en la tabla 4. Las bandas detectadas del espectro infrarrojo de la colágena de dentina, presentaron números de ondas características de las amidas anteriormente mencionadas lo que indica que el material obtenido es colágena.<sup>93,94,95</sup> El material inorgánico de la dentina de bovino fue eliminado debido a que no se observaron vibraciones características de la hidroxiapatita, las cuales se encuentran en un número de onda de  $3572\text{ cm}^{-1}$  (asociado al movimiento de O-H), en  $1085$ ,  $1016$  y en  $961\text{ cm}^{-1}$  (correspondientes al

movimiento P-O), en  $872\text{ cm}^{-1}$  (enlace C-O), y en  $562$  y  $373\text{ cm}^{-1}$  (a la vibración de O-P-O).<sup>89,96</sup>

**Tabla 4. Asignación de señales del infrarrojo de la colágena.<sup>97</sup>**

Grupo funcional	Número de onda [ $\text{cm}^{-1}$ ]
Amida A N=H estiramiento	3325-3300
Amida I C=O estiramiento	1636-1661
Amida II C-N estiramiento, N-H flexión	1537-1550
Amida III C-N estiramiento, N-H flexión, C-C estiramiento	1200-1300

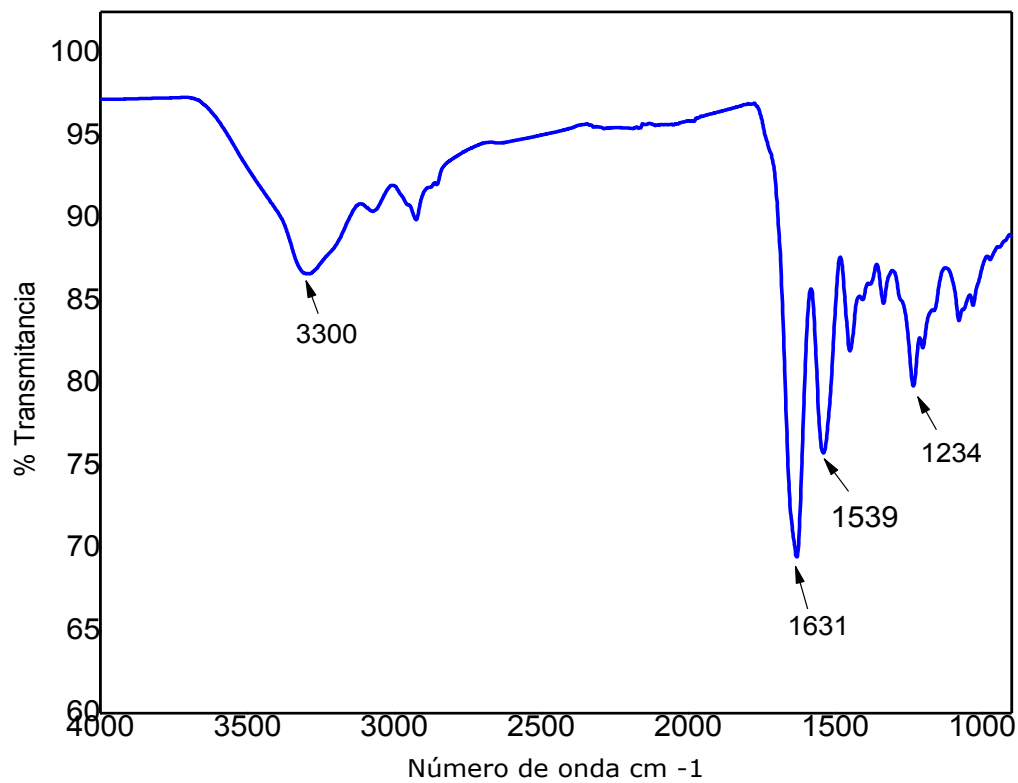


Figura 16. Espectro de infrarrojo de CoD.

Para cerciorarnos que efectivamente se obtuvo colágena a partir de la dentina, se realizó una comparación entre los espectros de infrarrojo de la colágena obtenida en este trabajo con la colágena comercial de piel de becerro (Elastin Products Company, Inc) empleada como la muestra control, contra la CoD. Se observa que las bandas características de la colágena se detectan en ambos espectros infrarrojos, sin embargo, la banda de  $1539\text{ cm}^{-1}$  del espectro infrarrojo de la CoD se encuentra recorrida hacia la derecha, comparada con la colágena comercial en la señal de  $1546\text{ cm}^{-1}$ . Esto implica que hubo un corrimiento de  $6\text{ cm}^{-1}$ . Algunos autores mencionan que puede estar la amida II en el intervalo de  $1537\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ .<sup>98</sup> (Figura 17).

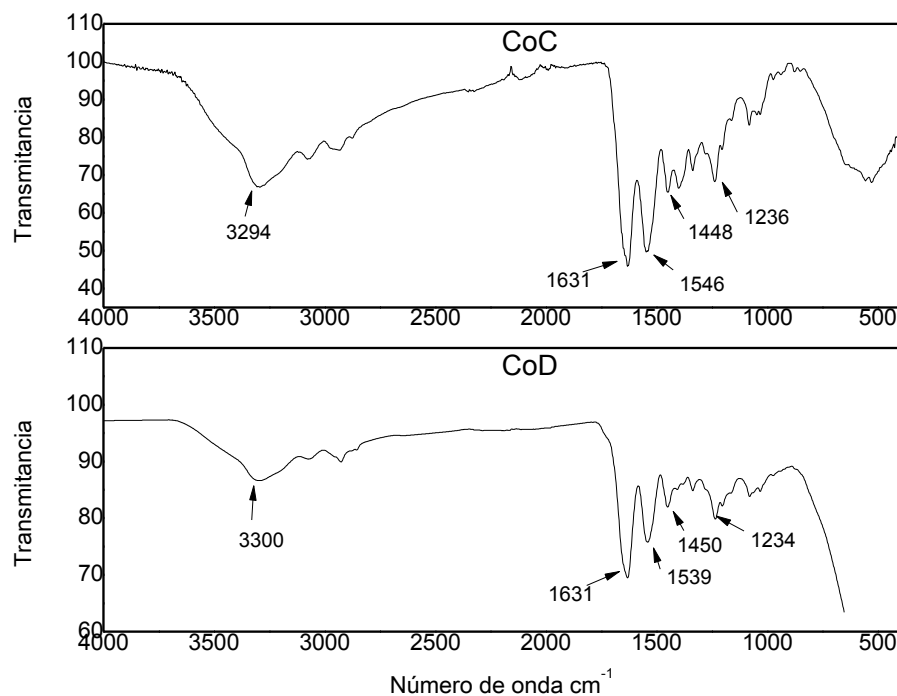


Figura 17. Comparación de los espectros infrarrojos de la muestra control y la experimental. Espectro de la colágena tipo I de piel de becerro (CoC) y el espectro de la colágena de dentina de bovino obtenida (CoD).

### **Microscopía Electrónica de Barrido**

La morfología de la CoD se observó por microscopía electrónica de barrido y como referencia, se utilizó la CoC. Las imágenes que se presentan a continuación, fueron tomadas por electrones retrodispersados y las muestras fueron recubiertas con oro. La micrografía de la Figura 18 a) corresponde a la colágena de origen de dentina de bovino. En ella se observó una conformación de membrana porosa como una red trabecular. Presentó una colocación aglomerada de partículas laminadas con forma irregular y la composición es homogénea. Al comparar la morfología de la muestra de CoD con la de CoC, se observan diferencias, porque la colágena de piel de becerro es una película compacta con dobleces, con algunas fibras y la composición de la muestra es homogénea (Figura 18 b) Las diferencias que se observaron en estos dos tipos de colágena se atribuyen al tipo de procesos al que fueron sometidas para su extracción. La CoD se obtiene con ácidos mientras que la CoC, de acuerdo con el instructivo fue obtenida con bases.



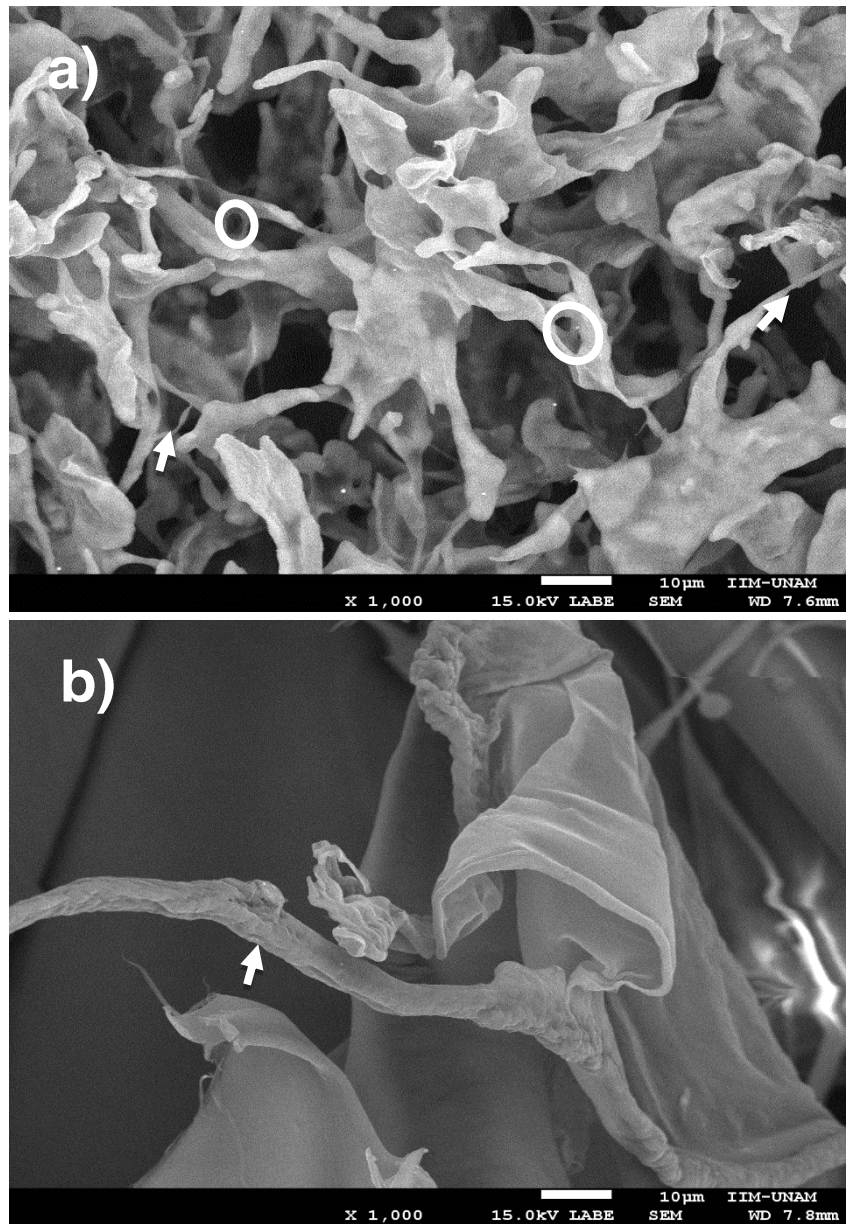
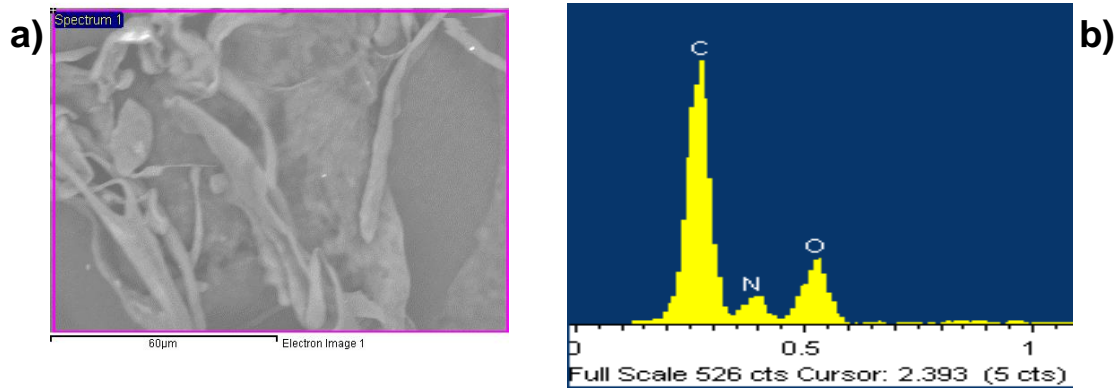


Figura 18. Micrografías de SEM de dos tipos de colágena, a) CoD y b) CoC, los círculos marcan los poros y en las flechas las fibras. Aumentos 1000 X.

### **Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)**

Esta técnica fue de utilidad para determinar que la colágena CoD no presenta material inorgánico de la dentina (hidroxiapatita). Como anteriormente se mencionó, el material inorgánico se encuentra compuesto por los siguientes elementos: Ca, P, C y elementos presentes en un porcentaje de 0.6 a 0.06 %, Na, Mg, K, F y Cl.<sup>89</sup> Sin embargo, en esta técnica nos enfocamos en buscar los elementos que se presentan en la dentina en mayor porcentaje, los cuales son el calcio y el fósforo. El análisis se realizó con una muestra de colágena de dentina, la cual no se recubrió de oro y fue colocada en el porta muestra con una cinta adhesiva de cobre. En la Figura 19 a) se observó la micrografía de CoD a una amplificación de 500 X y el recuadro rosa indica la zona donde se llevó a cabo el análisis elemental. En la Figura 19 b) se presenta el espectro del análisis de CoD y, por último, la tabla nos indica los resultados del análisis elemental, en donde se apreció la ausencia de calcio y fósforo. Debido a la ausencia de estos dos elementos se deduce que la colágena obtenida a partir de la dentina de bovino no presenta hidroxiapatita.



c)

Elemento	% Peso	% Atómico
C	44.52	49.47
N	35.91	34.21
O	19.57	16.32
Total	100.0 %	100 %

Figura 19. EDS de la muestra de CoD, en a) se observa la zona en donde se realizó el análisis, b) el espectro que indica la presencia de elementos como C, O y N y c) tabla con él % de los elementos encontrados.

### Análisis Termogravimétrico (TGA)

Esta es una técnica de apoyo para identificar la temperatura de la desnaturalización de la colágena de dentina de bovino. En la Figura 20 se presenta la derivada del termograma del TGA de la CoD. Se observó en el intervalo de temperaturas de 30 °C a 150 °C, la pérdida de masa del 14.6 %, que corresponde a la evaporación de agua absorbida por la estructura de la colágena. Posteriormente, se observó otra pérdida de masa del 1.5% en las temperaturas de 150 °C a 227 °C (punto de inflexión en la derivada del TGA), que involucra la desnaturalización y con ello un daño en la estructura terciaria de la CoD. Posteriormente, a partir de los 227 °C y hasta los 600

°C, se determinó una pérdida de masa del 62.1% lo que involucra pirolisis de la colágena de dentina de bovino.<sup>99</sup>

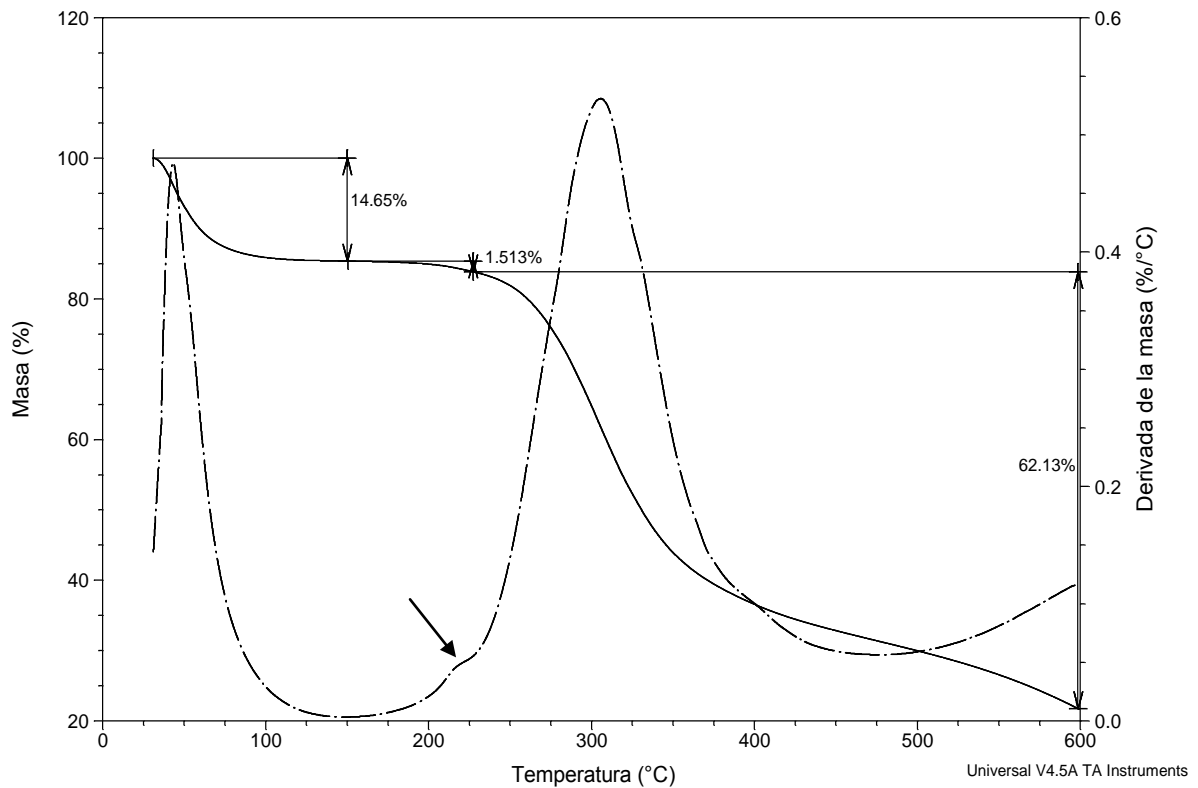


Figura 20. Termograma de CoD, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

En la Figura 21, se observó que la CoC presentó una pérdida de masa del 14.4% de los 30 °C hasta la temperatura de 144 °C, esto significa que presenta un porcentaje similar de evaporación de agua absorbida comparada con la CoD. Posteriormente hubo otra pérdida de masa del 1.6 % a partir de los 144 °C hasta los 217.1 °C y, finalmente, hay otra disminución de masa de los 217 °C hasta 600 °C con un total de

porcentaje de masa pérdida del 69.9 % que corresponde a la degradación de la colágena.<sup>100</sup> El comportamiento de la CoD es similar a la colágena de piel de becerro.

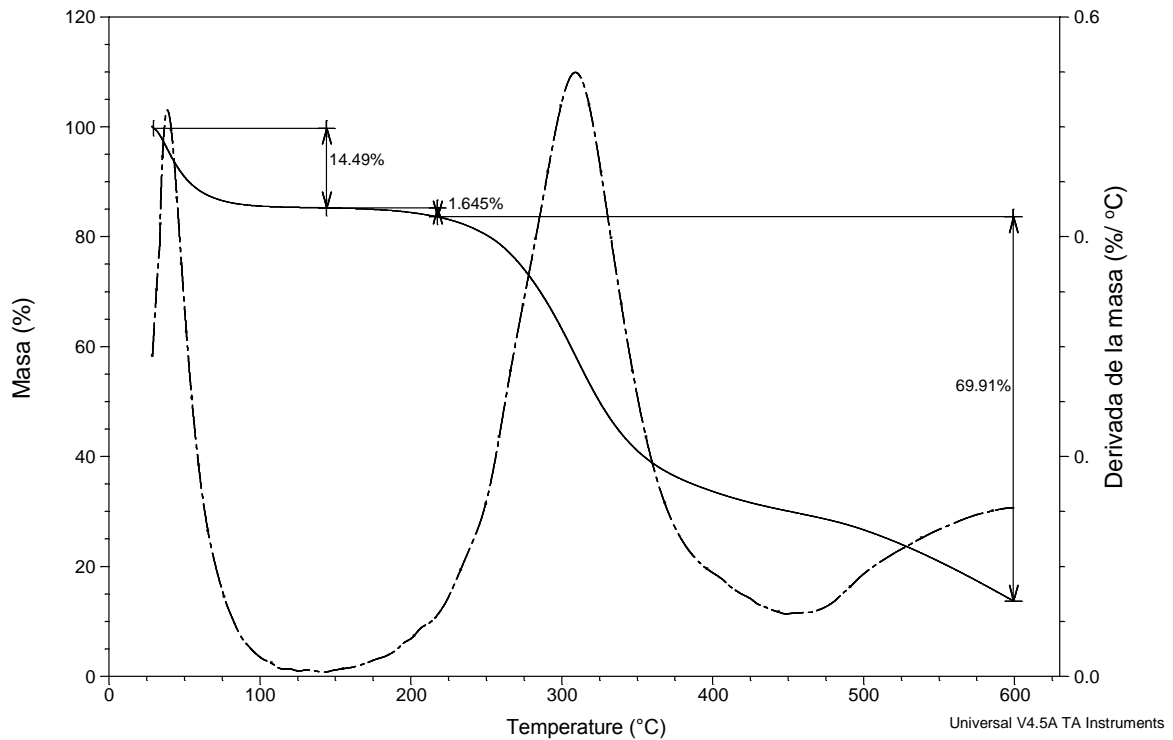


Figura 21. Termograma de CoC, a una velocidad de calentamiento de 10 oC/min.

### Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

En la prueba de DSC de la colágena de dentina (CoD) se observó un termograma que presentó dos procesos endotérmicos (Figura 22), en el primer proceso endotérmico con un pico máximo de una temperatura de 85.65 °C, el cual corresponde a la pérdida del agua que contiene la colágena, posteriormente el segundo pico

máximo endotérmico a una temperatura de 226 °C, se le atribuye a la desnaturalización de la proteína. La temperatura de desnaturalización en la colágena puede estar presente en un intervalo de temperaturas de 60 °C a 250°C dependiendo de la cantidad de agua u otras moléculas presente.<sup>98</sup>

Por otra parte, la CoC presenta un termograma de calorimetría de barrido con dos procesos endotérmicos, el primero se localizó a la temperatura de 98.45 °C y el segundo a la temperatura de 217 °C. La temperatura de desnaturalización de la CoD se presentó a los 10 °C para arriba de la CoC. Sin embargo, esta diferencia de temperatura de desnaturalización de 10 °C, entre estas colágenas depende de la cantidad de agua o por la fuente de donde se realizó la extracción de la colágena<sup>101</sup>

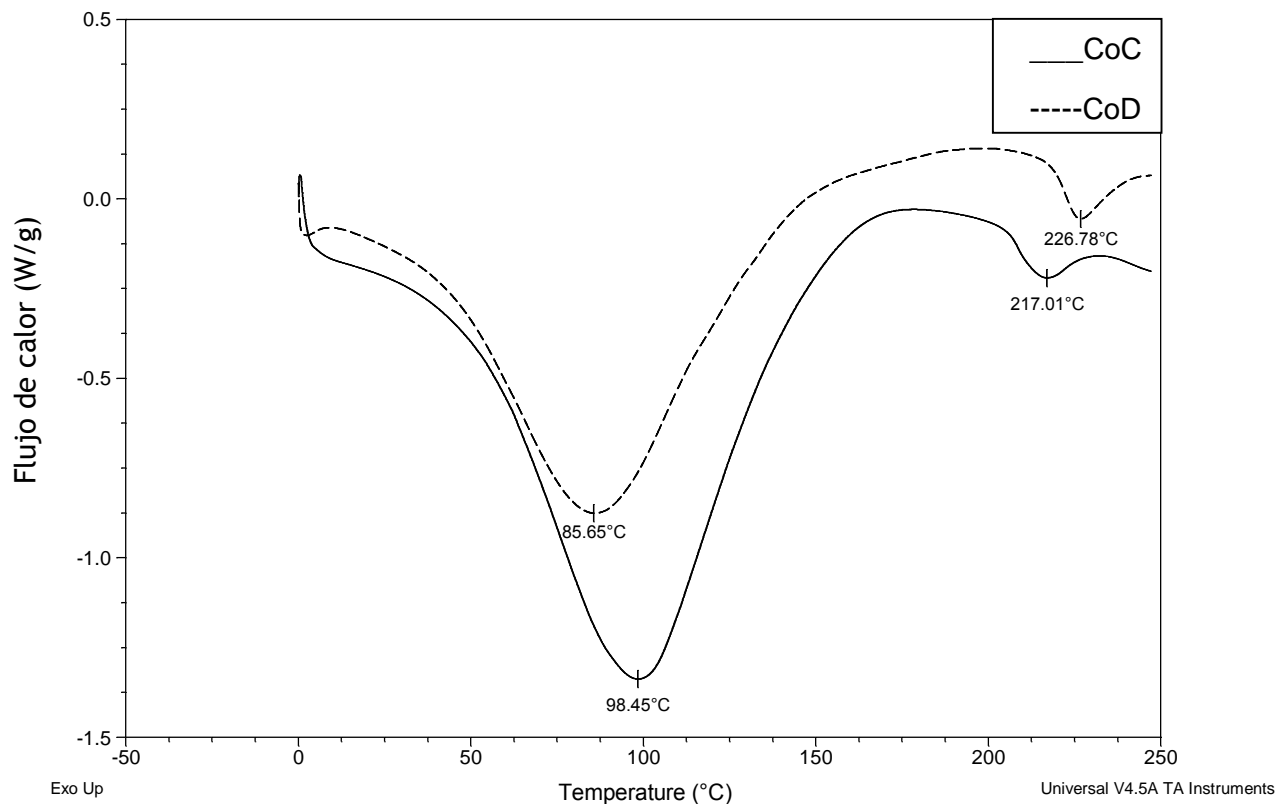


Figura 22. Termograma de DSC de CoC y CoD.

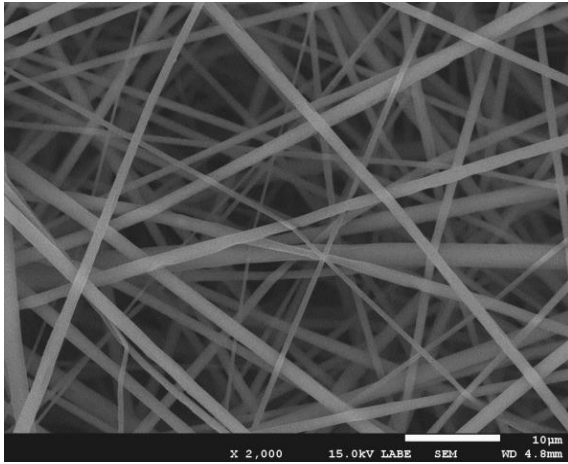
## **Andamios Electrohilados de PLA y PLA: CoD**

Las soluciones de PLA y PLA: CoD se prepararon bajo las condiciones mencionadas en capítulo IV. Estas soluciones fueron electrohiladas bajo los parámetros que se señala en la tabla 3 del capítulo IV. Cabe mencionar que partimos de parámetros que se mencionan en la literatura.<sup>86</sup> Estos parámetros se modificaron con el fin de obtener andamios con fibras homogéneas y con el menor diámetro posible para imitar la matriz extracelular. Todas las muestras se realizaron en condiciones ambientales, en donde la temperatura fue de 23 °C y una humedad relativa del 30%.

### **Andamios Electrohilados de PLA y PLA:CoD al 13%**

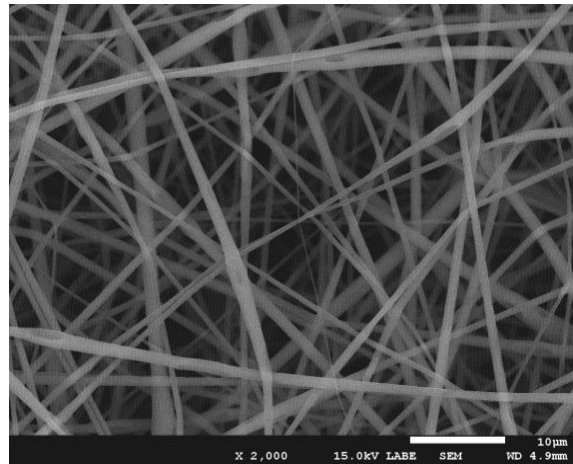
La solución de PLA al 13% en TFE p/v (F13), se electrohiló a un voltaje de 10 kV, a una distancia de 10, 15 y 25 cm de la salida de la aguja hacia el colector y se utilizó una aguja con un diámetro de 0.80 mm. Con este grupo de andamios se observó el efecto de la distancia de la aguja al colector en la morfología de las fibras. En las micrografías de la Figura 23 se observó que a 10 cm de distancia se obtiene un diámetro de fibra de 925 nm, comparada con la distancia de 25 cm en donde disminuye el diámetro a 864 nm. Sin embargo, las fibras con un menor diámetro (de  $813 \pm 351$  nm) se obtuvieron a una distancia de 15 cm, como se muestra en la Figura 23 b). Por otra parte, a mayor distancia se obtuvo una desviación estándar menor, lo que significa que tenemos diámetros de fibras del andamio más homogéneas, como se observa en la Figura 23 c).

957 ± 405 nm



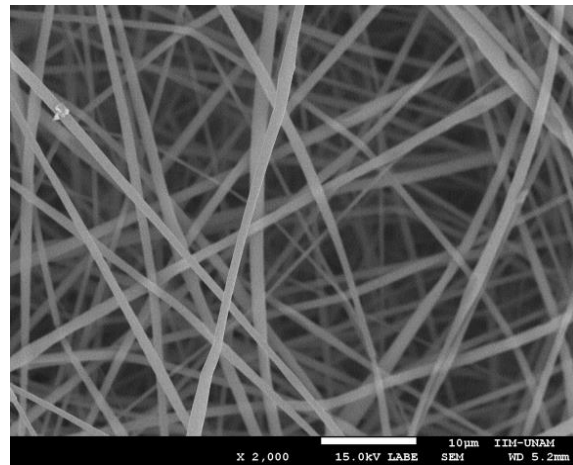
a)

813 ± 351 nm



b)

864 ± 337 nm



c)

Figura 23. Micrografías de andamios de PLA al 13%, con un voltaje de 10 kV. Se observa el efecto de la distancia en los andamios sobre las fibras, a) 10 cm, b) 15 cm, c) 25 cm, a 2000 X.

Con el fin de encontrar las condiciones idóneas para electrohilar andamios de PLA con menor diámetro de fibras, se decidió estudiar el efecto del voltaje sobre la morfología de las fibras de los andamios. Para ello se electrohiló la solución F13 a tres distintos voltajes: 10 kV, 13 kV y 20 kV y con tres distancias entre la aguja y el colector: 10, 15 y 25 cm. En las imágenes de la Figura 24 se observó la micrografía b) y c) de los



andamios que presentan diámetros de fibras de  $813 \pm 351$  y  $864 \pm 337$  nm respectivamente, al comparar estos diámetros con los andamios que se electrohilan a 20 kV en las micrografías h) e i), se observó un aumento en la desviación estándar ( $794 \pm 608$  y  $705 \pm 540$  nm). Estas fibras tienen una mayor heterogeneidad de diámetros a un mayor voltaje con una distancia de 15 y 25 cm. Cuando se electrohilan andamios a una distancia de 10 cm y a 10 kV se obtiene fibras de 957 nm (Figura 24 a). El diámetro disminuye al electrohilar a 13 kV (825 nm) y a 20 kV (562 nm), figura 21 d) y g). Por lo tanto, cuando se electrohiló a una menor distancia y a mayor voltaje.

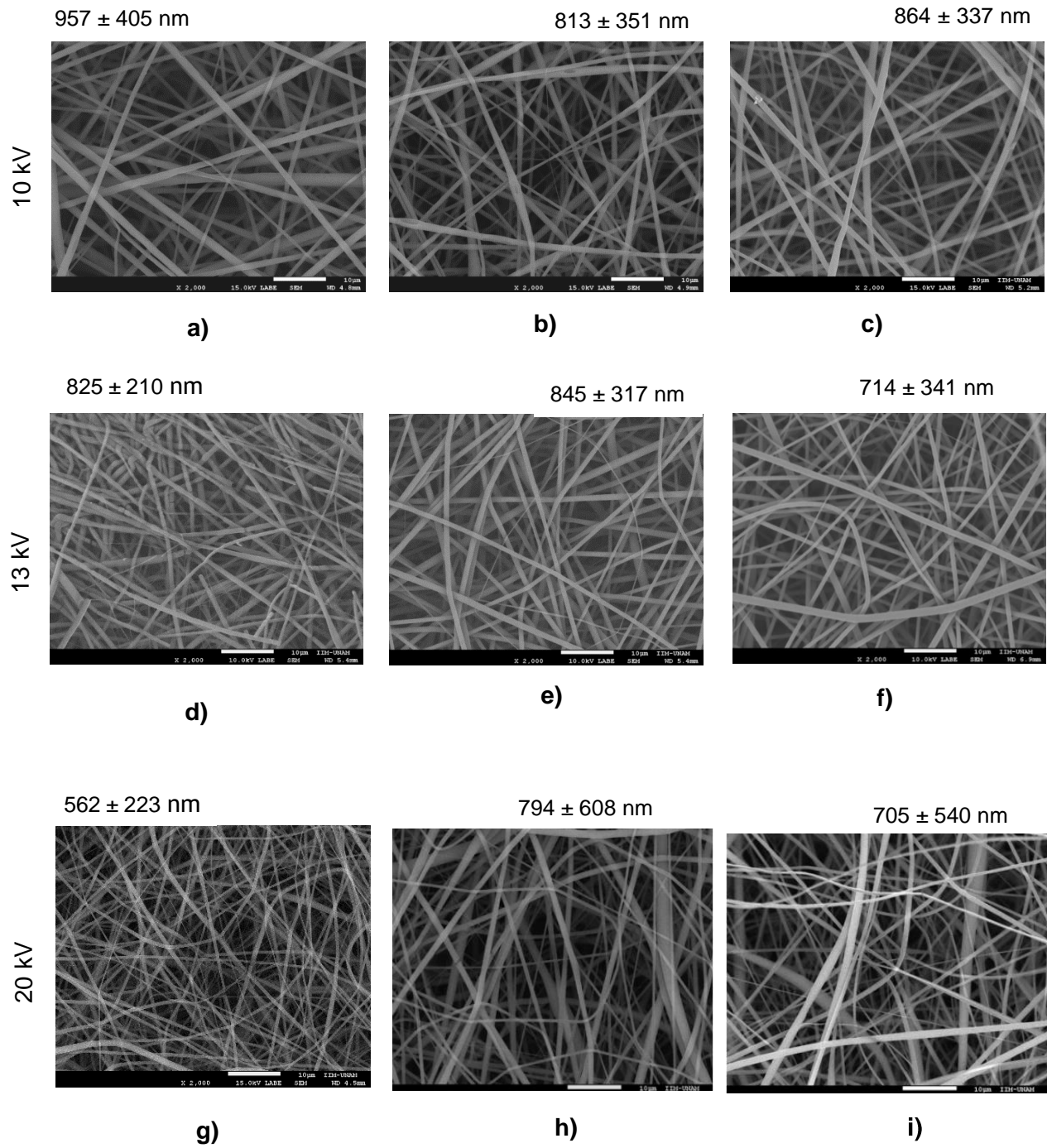


Figura 24. Micrografías de SEM de andamios de PLA 13%, a) 10 kV - 10 cm; b) 10 kV - 15 cm; c) 10 kV -25cm; d) 13 kV –10 cm; e) 13 kV - 15 cm; f) 13 kV – 25 cm.; g) 20 kV- 10 cm; h) 20 kV- 15 cm; i) 20 kV-25 cm. Micrografías a X 2000 y escala 10 micras.

Después de observar los andamios electrohilados de PLA puro, se procedió a electrohilar PLA con colágena a una proporción de 30:1 en peso, con una concentración final de PLA del 13% p/v, que corresponde a la solución CF13. Se electrohiló a 10 kV y a 13 kV, y a las distancias entre la aguja y el colector de 10, 15 y 25 cm. La velocidad de inyección fue de 0.4 mL/h, con una aguja de 0.8 mm de diámetro y un volumen de 1mL. En la Figura 25 se observó que los electrohilados, tanto a 10 kV como a 13 kV, presentaron defectos, denominados bulbos, además se observa ensanchamiento del diámetro en algunas zonas de la fibra. A una distancia de 15 cm, a 10 kV y 13 kV, la presencia de estos defectos es menor, de acuerdo a las micrografías c y d de la Figura 25.

De esta forma al agregar colágena de dentina de bovino a la solución de PLA con TFE al 13 % y electrohilada, la morfología de las fibras resultan ser afectadas, comparada con los andamios de la solución de F13, en donde no se observaron los defectos de las fibras.

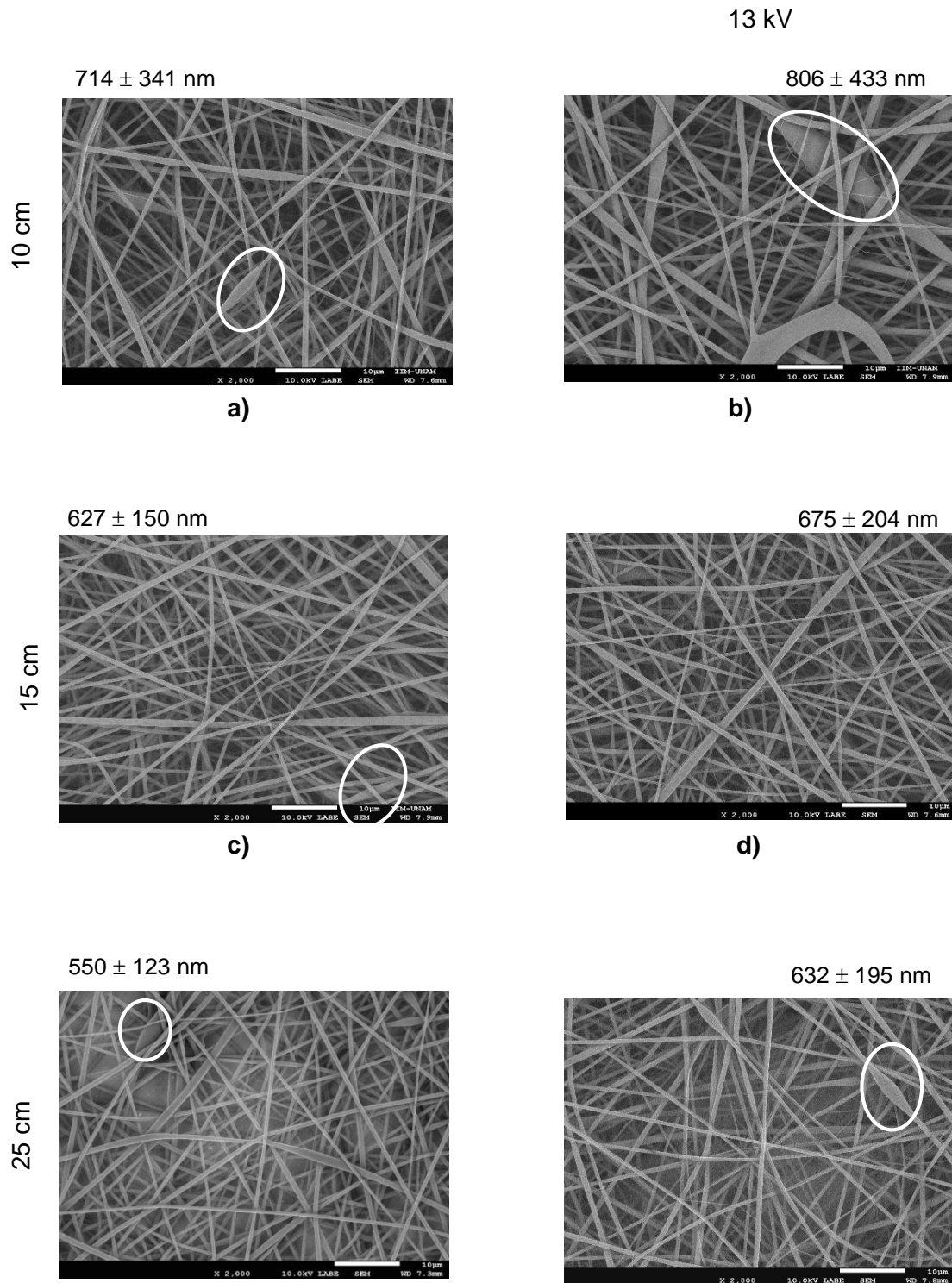


Figura 25. Micrografías de SEM de andamios de PLA:CoD (30:1) al 13% en TFE p/v, a) 10 kV - 10 cm; b) 13 kV - 10 cm; c) 10 kV -15cm; d) 13 kV-15 cm; e) 10 kV - 25 cm; f) 13 kV – 25 cm. Micrografías a X 2000 y escala de 10 micras.

## Andamios Electrohilados de PLA:CoD al 16%

Se buscó optimizar los parámetros para obtener fibras electrohiladas de PLA con colágena de dentina de bovino, con diámetros de 50 a 500 nm y sin defectos. Para ello se tomó en cuenta que la solución CF13 con una proporción de PLA: colágena de 30:1 proporción en peso. Bajo los parámetros que se electrohilaban, no fueron adecuados para tener fibras sin defectos debido que al agregar colágeno a la solución de PLA y electrohilarla se observaron bulbos en las fibras. De esta forma se decidió aumentar la concentración al 16% (F16) por que en la literatura se menciona que los bulbos formados en las fibras, se atribuyen a una baja concentración de la solución y al disolvente que se utiliza.<sup>102</sup> Por tal razón se electrohiló ahora PLA al 16%, para observar su comportamiento y, posteriormente, elaborar fibras de PLA al 16% con CoD a una proporción 30:1 y 15:1. Como disolvente se utilizó TFE y un sistema de disolvente: TFE con ácido acético (99:1 proporción en volumen).

En las micrografías de SEM (Figura 26) se observan los andamios electrohilados de la solución de PLA al 16% en trifluoroetanol (solución F16). Para su formación se usaron 10 y 13 kV, y una distancia de la aguja hacia el colector de 10, 15 y 25 centímetros, los demás parámetros (el diámetro de la aguja y el flujo de inyección) se mantuvieron constantes.

En la Figura 26 a) se observa un andamio electrohilado a 10 kV y con una distancia de 10 cm, este andamio presentó diámetros de fibras de  $1093 \pm 171$  nm, sin embargo, a una distancia de 25 cm el diámetro promedio disminuyó a  $943 \pm 243$  nm. Con respecto al voltaje cuando se electrohiló la solución de PLA/TFE al 16%, a 13 kV los

diámetros de la fibras (808, 947, 840 nm) disminuyen al compararlos con los andamios electrohilados a 10 kV (1093, 1211, 943 nm).

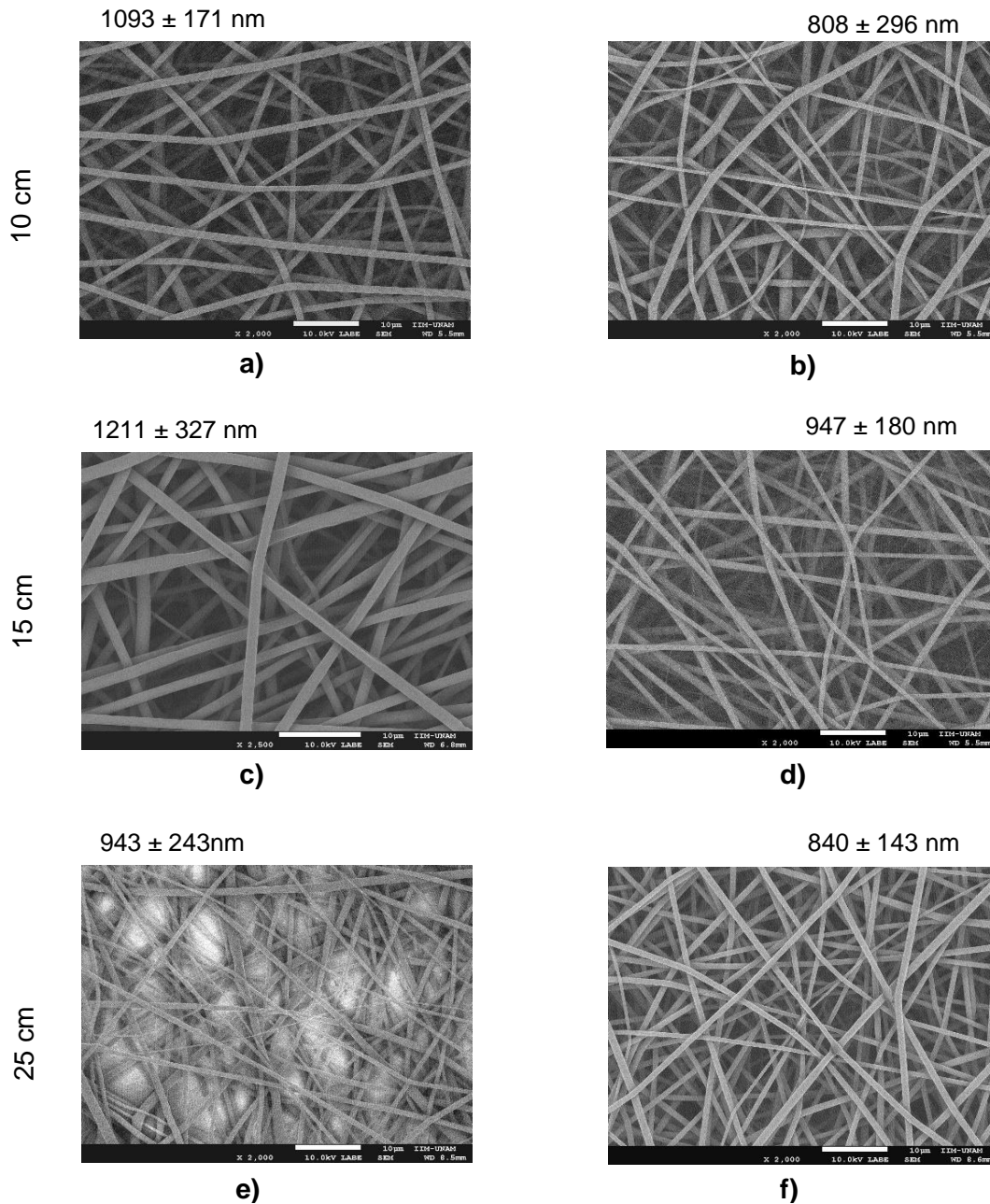


Figura 26. Imágenes de microscopía de barrido de andamios de PLA en TFE al 16%. Andamios electrohilados a) 10 kV - 10 cm; b) 13 kV-10 cm; c) 10kV -15cm; d) 13 kV – 15 cm; e) 10 kV - 25 cm; f) 13 kV – 25 cm. Micrografías a 2000 X y escala 10 micras.

La Figura 27 presenta las fibras de los andamios electrohilados de PLA a una concentración del 16% en el sistema de disolventes de TFE/AC. Se observó un diámetro promedio de fibras de 823, 956, 853 nm en la imágenes a, c y e de la Figura 27, el cual es menor al compararlas con los diámetros de fibras de las imágenes a, c y e de la Figura 26 (1093, 1211, 943 nm), en donde se utilizó como disolvente solamente el TFE. En el grupo de micrografías de andamios de PLA al 16% en TFE/AC se presenta menor diámetro promedio de fibras de  $706 \pm 166$  nm, a una distancia de 25 cm con un voltaje de 13 kV.

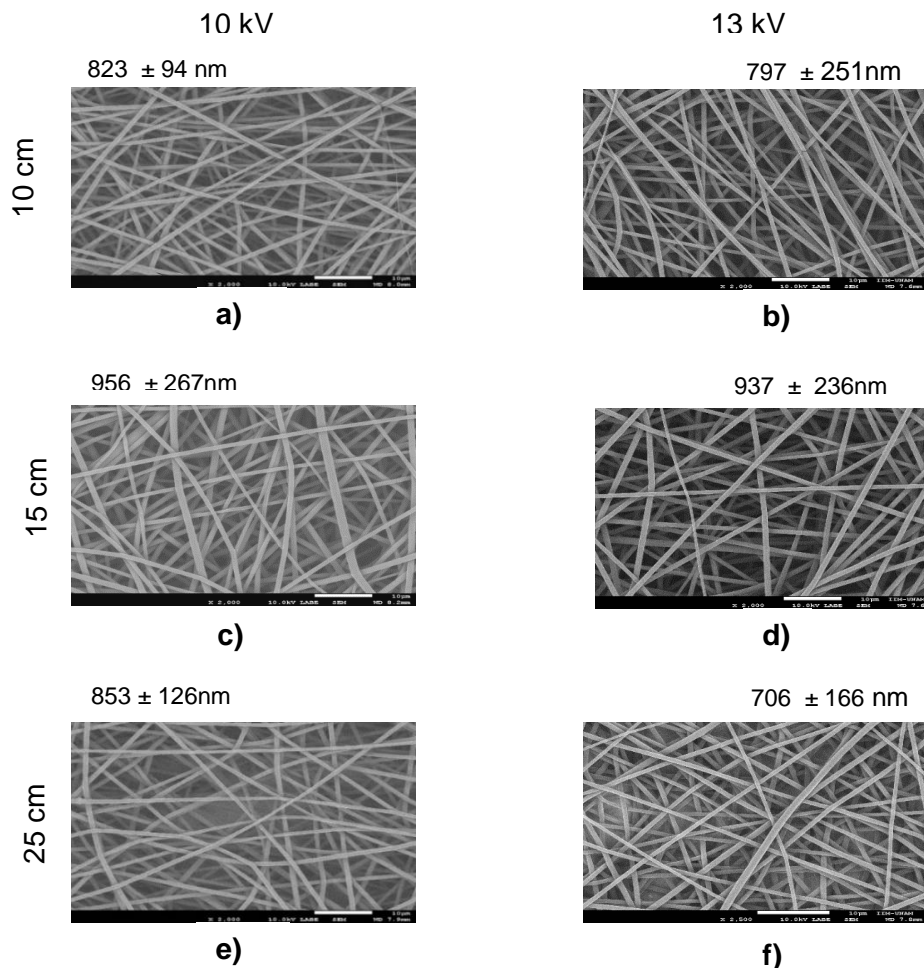


Figura 27. Imágenes de microscopía de barrido de andamios de PLA en TFE/AC al 16%. Andamios electrohilados a) 10 kV - 10 cm; b) 13 kV-10 cm; c) 10kV -15cm; d) 13 kV – 15 cm; e) 10 kV - 25 cm; f) 13 kV – 25 cm. Micrografías a 2000 X y escala 10 micras.

La incorporación de colágena de dentina (30:1) a la solución de PLA al 16% en TFE p/v, afectó en el diámetro de las fibras y al electrohilar esta misma concentración de solución pero con el sistema de disolventes, el diámetro disminuye aún más. Esto se demuestran cuando se electrohilan los andamios de PLA al 16% con colágena de dentina (30:1) disuelto en trifluoroetanol, con una distancia de 15 cm y 10 kV. En la micrografía c) de la Figura 28 obtenemos un diámetro promedio de fibras de 711 nm con una desviación estándar de 205 nm. Comparada con la micrografía de PLA en TFE a 15 cm y 10 kV (Figura 26 c), la cual tiene un diámetro promedio de 1211 nm y una desviación estándar de 327 nm, por lo cual el diámetro promedio de las fibras disminuye al agregar colágena de dentina de bovino a la solución de PLA al 16% en TFE. Al comparar todas las micrografías de la Figura 28, las condiciones donde se obtuvo menor diámetro de fibras, de 662 nm, fue a una distancia de 10 cm y a 13 kV, sin embargo tiene una desviación estándar de 351 nm.

Por otra parte, la Figura 29 corresponde a las fibras de PLA: CoD (30:1) y se utilizó como disolvente TFE/AC (99:1), se realizó electrohilado a 10 y 13 kV, a una distancia de 10, 15 y 25 cm. Se distingue en la micrografía de la Figura 29 c) el diámetro promedio de las fibras de este andamio que es de 465 nm y una desviación de estándar de 100 nm, los diámetros promedio de estas fibras es menor, comparada con la micrografía de la Figura 28 c) con un diámetro promedio de 711 nm y una desviación de estándar de 205 nm. Las fibras de los andamios electrohilados a 10 kV de la figura 29 a) c) e) son de menor diámetro (diámetros de fibras 487, 465, 465 nm), comparados con los andamios electrohilados de la figura 28 b) d) y f) (diámetros de fibras 711, 711,



851 nm), esto se debe al emplear diferente disolvente para la preparación de la solución.

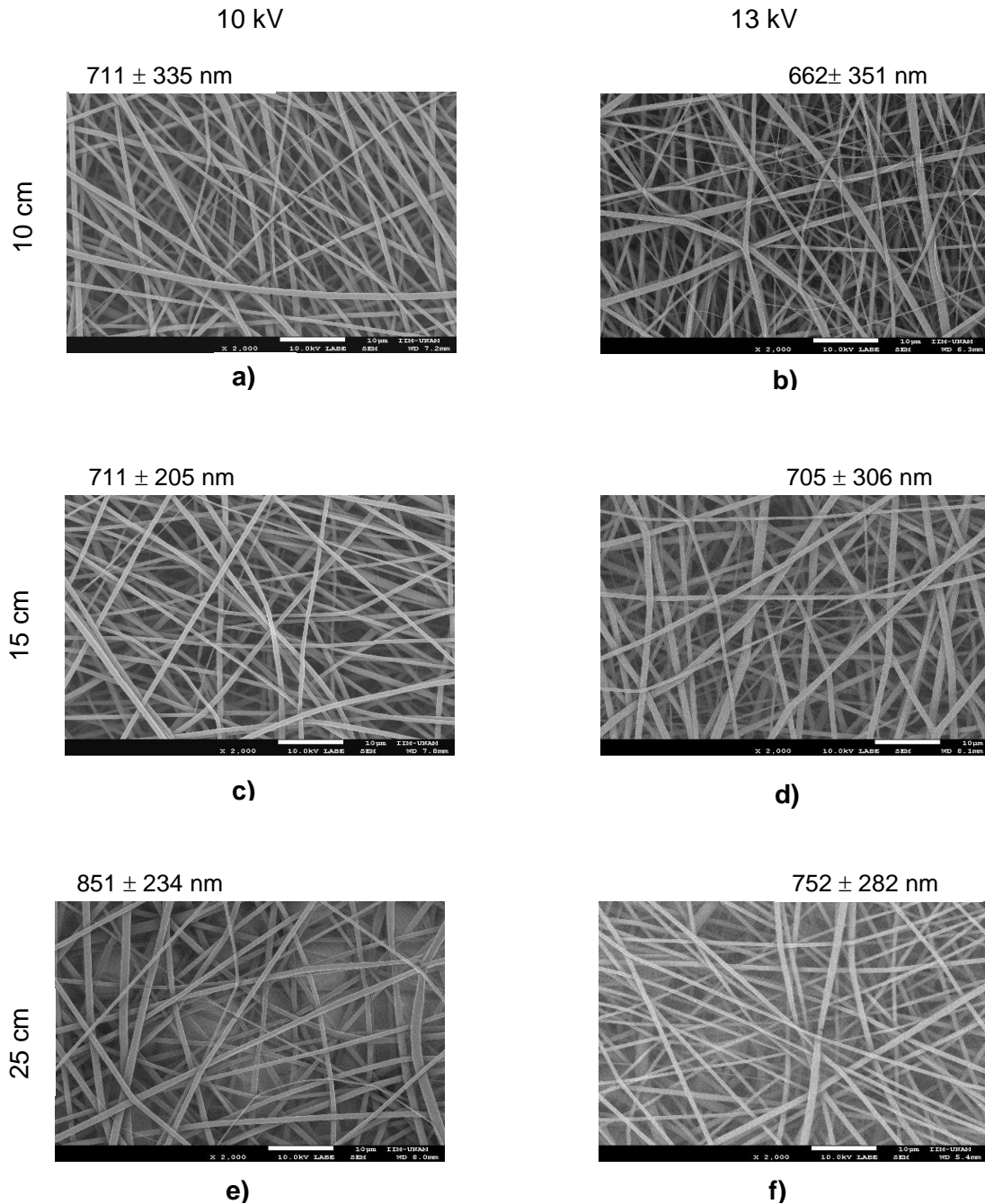


Figura 28. Imágenes de microscopía de barrido de las fibras de la solución CF16 (30:1), a) 10 kV - 10 cm; b) 13 kV - 10 cm; c) 10kV -15cm; d) 13 kV – 15 cm; e) 10 kV - 25 cm; f) 13 kV – 25 cm. Micrografías a 2000 X y escala de 10 micras.

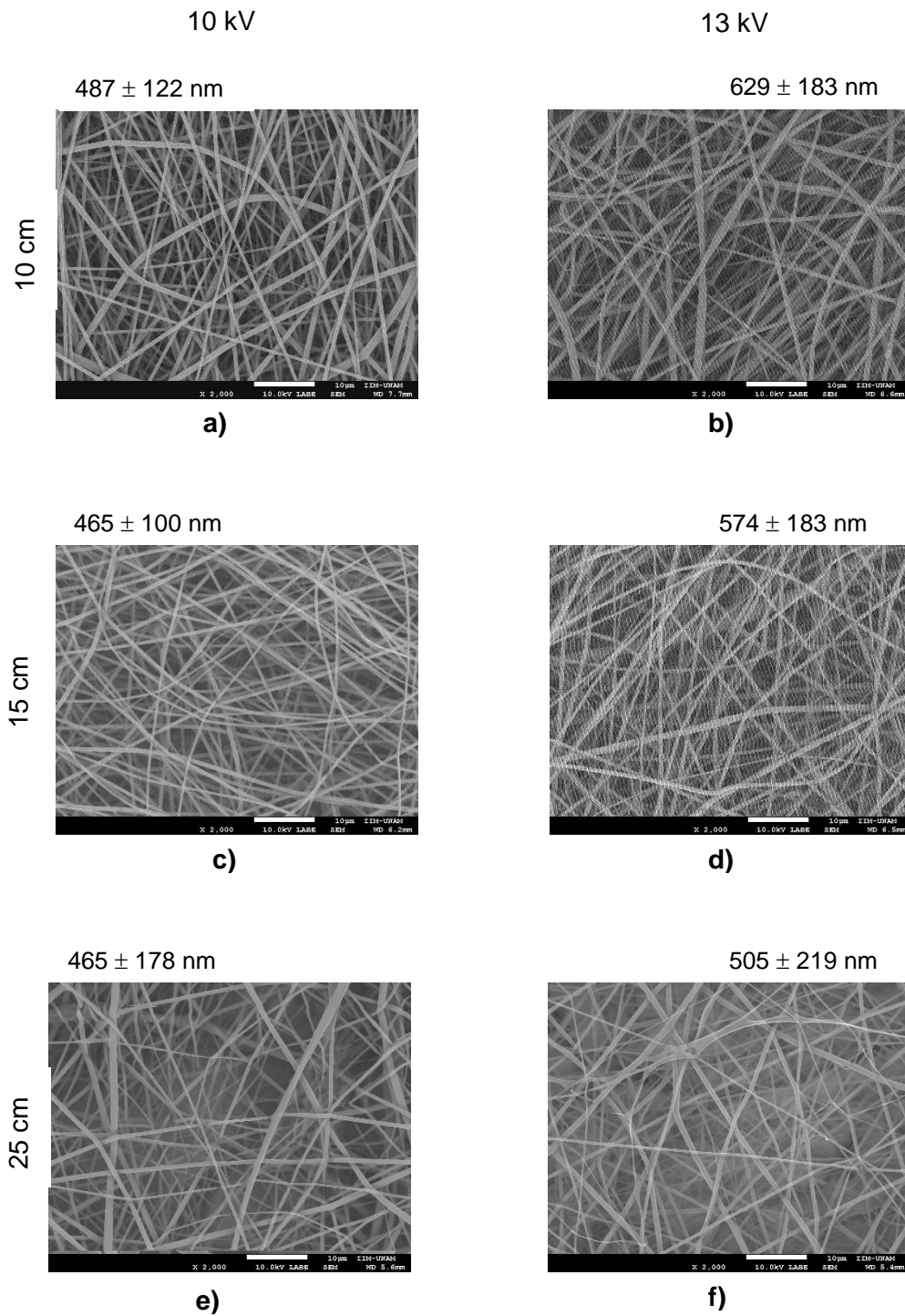


Figura 29. Micrografías de SEM de los andamios de PLA: CoD (30:1) al 16 % en TFE/AC, a) 10 kV - 10 cm; b) 13 kV - 10 cm; c) 10kV -15cm; d) 13 kV – 15 cm; e) 10 kV - 25 cm; f) 13 kV – 25 cm. Micrografías a 2000 x y escala de 10 micras.

Una mayor cantidad de colágena de dentina en una proporción 15:1 a la solución de PLA al 16% en TFE (Figura 30), provocó la reducción de los diámetros promedio de las fibras de los andamios a  $600 \pm 217$  nm (Figura 30 c), comparado con los diámetros de fibras de  $711 \pm 205$  nm (Figura 28 c) que corresponde a los andamios con proporción de colágena 30:1. Por otra parte, en el electrohilado a 25 cm y a 13 kV presentó un diámetro promedio de fibras de  $917 \pm 330$  nm (Figura 30 f). El diámetro promedio de las fibras es mayor al comparar con los andamios de PLA:CoD 30:1 al 16% en TFE los cuales tuvieron un diámetro de fibras de  $752 \pm 282$  nm (Figura 28 f).

Los andamios electrohilados a 10 kV y a una distancia de la aguja al colector de 10, 15 y 25 cm de la solución de PLA:CoD 15:1 TFE, confrontados con los andamios de PLA:CoD 15:1 TFE/AC a las mismas distancias. Se determinó que los andamios de la primera solución presentaron fibras promedio de  $601 \pm 238$ ,  $600 \pm 217$  y  $791 \pm 300$  nm (Figura 30 a, c y e). Los andamios de PLA:CoD 15:1 TFE/AC obtuvieron fibras promedio de  $472 \pm 152$ ,  $524 \pm 154$  y  $442 \pm 92$  (Figura 31 a, c y e), por lo tanto, disminuyó el diámetro promedio de las fibras cuando se utiliza como disolvente TFE/AC, al compararlos con los andamios que se electrohilaron en donde se utilizó como disolvente solamente el TFE. En el grupo de los andamios de PLA:CoD 15:1, en TE/AC, electrohilados a 13 kV presentan mayor desviación estándar de los diámetros de las fibras de 331 nm (Figura 31 a), comparados con los andamios de 10 kV, que presento la desviación estándar de 238 nm. La distancia de la aguja hacia el colector para obtener menor diámetro de fibras la solución de PLA: CoD TE/AC 15:1 con el menor diámetro fue a 25 cm (Figura 31 e).

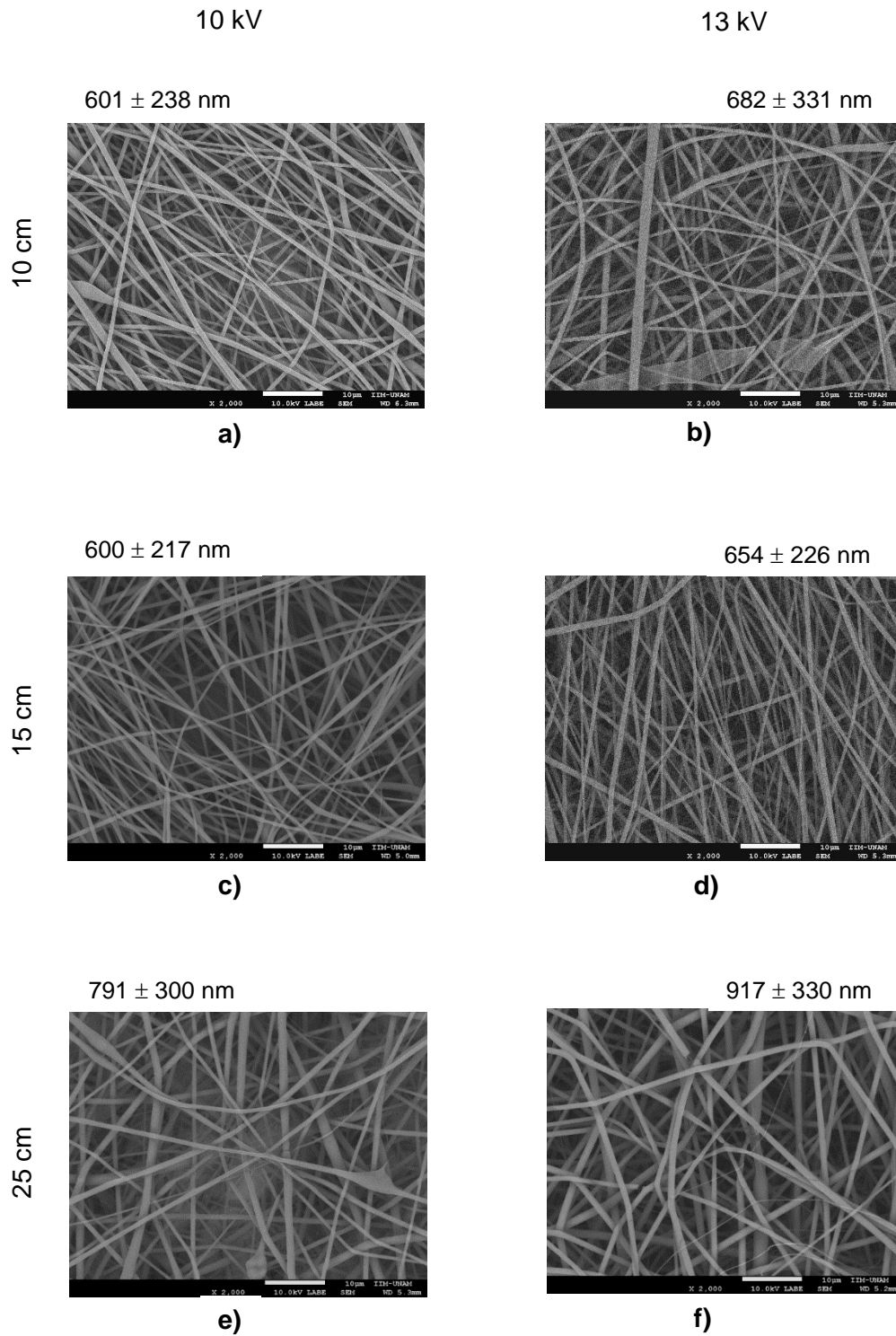


Figura 30. Micrografías de las fibras electrohiladas de la solución C5F16, a) 10 kV - 10 cm; b) 13 kV - 10 cm; c) 10kV -15cm; d) 13 kV – 15 cm; e) 10 kV - 25 cm; f) 13 kV – 25 cm. Micrografías a 2000 X y escala de 10 micras.

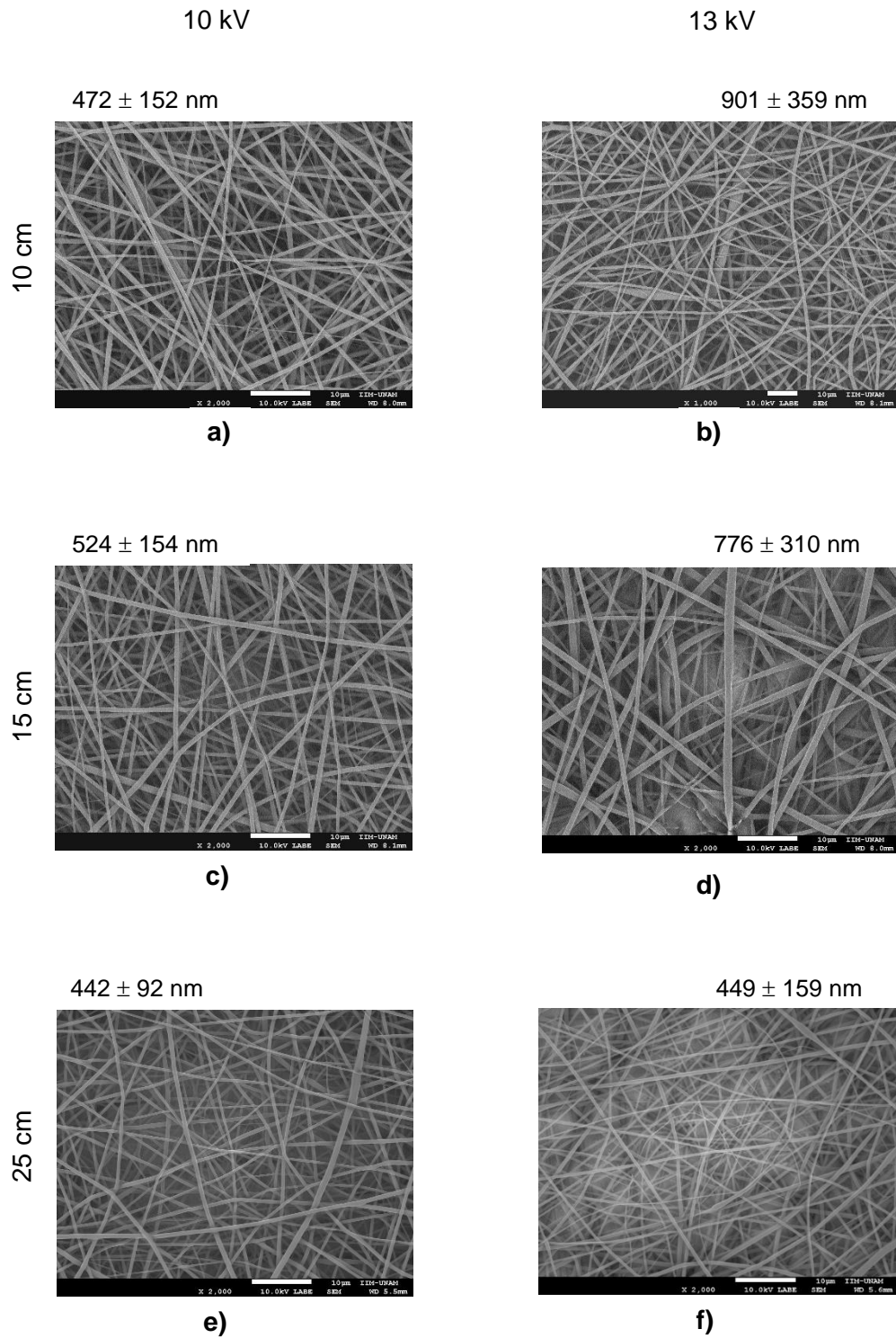


Figura 31. Imágenes de SEM de los andamios electrohilados de la solución. C5T-A16, a) 10 kV - 10 cm; b) 13 kV - 10 cm; c) 10kV -15cm; d) 13 kV – 15 cm; e) 10 kV - 25 cm; f) 13 kV – 25 cm. Micrografías a 2000 x y escala 10 micras.

Con el fin de determinar la distancia adecuada para electrohilar idealmente nuestra solución polimérica, se realizó una gráfica de la influencia de la distancia, contra el diámetro promedio de los datos anteriores de las fibras electrohiladas de PLA, PLA: CoD (30:1) y PLA: CoD (15:1), a una concentración del 16% con TFE y TFE/AC como disolvente. Se dejó constante el voltaje (10 kV), el flujo (0.4 mL/hr) y diámetro de aguja 0.80 mm. Se decidió ya no obtener las fibras a 13 kV, porque de acuerdo con los resultados anteriores, se obtuvo una desviación estándar mayor, bajo las mismas condiciones del electrohilado anteriormente mencionadas.

En la Figura 32 se observa los diámetros promedios y su desviación estándar de los andamios con PLA al 16% en TFE y en el sistema de disolvente TFE/AC. De acuerdo con la figura 32, al utilizar el sistema de disolvente (TFE/AC) los diámetros de las fibras disminuyen, comparados con los diámetros de las fibras de TFE. Los menores diámetros de fibras de PLA se obtuvieron a una distancia de 10 cm y con el sistema de disolvente.

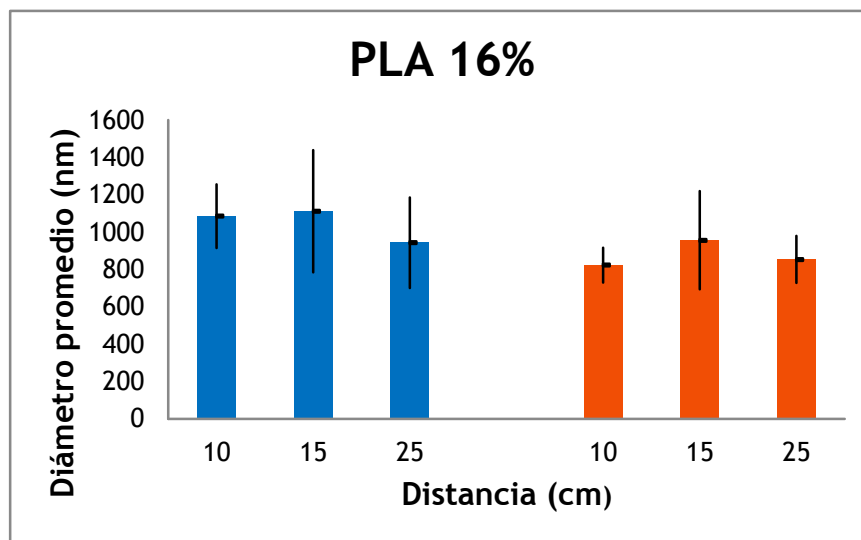


Figura 32. Gráfica del efecto del disolvente y la distancia en los andamios electrohilados de PLA 16%.

Por otra parte, para conocer el efecto del contenido de la colágena sobre los diámetros promedio de las fibras de los andamios, se usaron 2 porcentajes de la proteína. Al agregar un porcentaje de colágena al PLA (30:1) en TFE/AC se obtienen menores diámetros promedio de las fibras comparadas con las de PLA/TFE/AC, se observa claramente en la Figura 33. La diferencia entre los diámetros promedio es de 100 nm aproximadamente. La distancia ideal para obtener andamios de PLA: CoD (30:1) con menor diámetro de fibras es a 15 cm y se debe utilizar el sistema de disolventes TFE/AC.

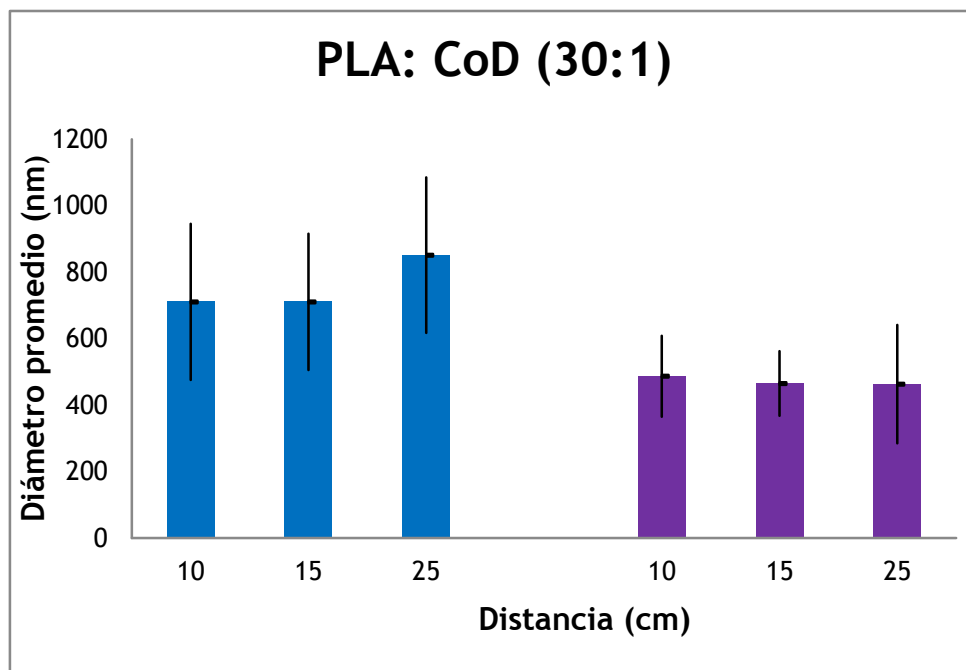


Figura 33. Gráfica del efecto del disolvente y la distancia en los andamios electrohilados de PLA: CoD (30:1) al 16%.

Los diámetros de las fibras de los andamios de PLA:CoD (15:1) en TFE/AC disminuyen respecto a los andamios que usaron TFE (Figura 34). La distancia de la aguja al

colector también afecta en el diámetro debido a que al electrohilar PLA: CoD (15:1) en TFE/AC se obtiene menor diámetro de fibras a 25 cm, comparadas con los andamios electrohilados de PLA: CoD (15:1) en TFE a esa misma distancia, en donde aumentó los diámetros de las fibras y la desviación estándar.

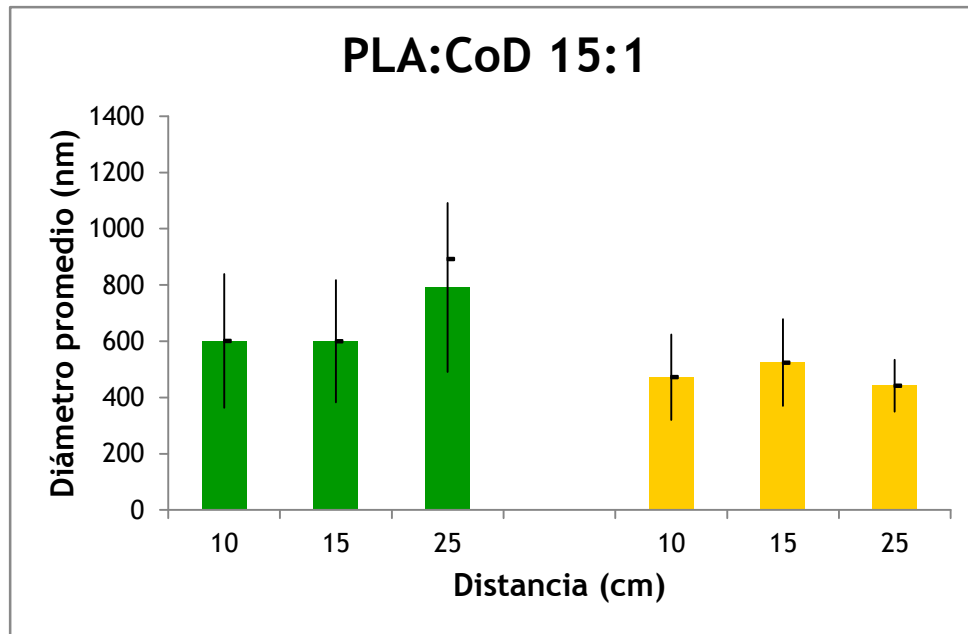


Figura 34. Gráfica del efecto del disolvente y distancia en los andamios electrohilados de PLA: CoD (15:1) al 16% .

Con los resultados anteriores se concluye que las condiciones apropiadas para electrohilar PLA con colágena de dentina de bovino encontradas en este trabajo, se debe utilizar una solución con una concentración final de 16 %, y con el sistema de disolventes TFE/AC. El voltaje adecuado es de 10 kV y no a 13 kV, debido a que a mayor voltaje la desviación estándar de fibras es mayor y por lo tanto se tiene fibras más heterogéneas, sin embargo el diámetro promedio es mayor a 13 kV por 7 nm (Figura 31 e y f). Las distancias convenientes para electrohilar nuestras soluciones de



PLA:CoD es a 25 cm, con un flujo de inyección de 0.4 mL/hr y con una diámetro de aguja de 0.80 mm de diámetro.

En la tabla 5 se resumen los seis andamios con sus respectivas condiciones finales para el electrohilado. A estos andamios se les determinó el porcentaje de área porosa, sus propiedades mecánicas e hidrofóbicas.

**Tabla 5. Andamios con los parámetros finales.**

Solución (16%)	Disolvente	Voltaje	Distancia (de la aguja hacia el colector)	Flujo	Diámetro de la aguja
PLA	TFE	10 kV	25 cm	0.4 mL/hr	0.80 mm
PLA	TFE/AC				
PLA;CoD (30:1)	TFE				
PLA;CoD (30:1)	TFE/AC				
PLA:CoD (15:1)	TFE				
PLA:CoD (15:1)	TFE/AC				

## **Caracterización de los Andamios Electrohilados con los parámetros finales de PLA y PLA: CoD**

### **Porcentaje de Área Porosa**

En la tabla 6 se muestran los datos de los resultados del área porosa relativa de los andamios de PLA y PLA: CoD al 16%. Los andamios fueron electrohilados en las condiciones que se muestran en la tabla 5. Los andamios de PLA/TFE presentaron un porcentaje de área porosa de 56.5% comparada con los andamios de PLA:CoD (30:1)

TFE, que presentó un porcentaje de 58.8% el área porosa de los andamios aumentó cuando disminuye el diámetro de las fibras, aunque esto también puede deberse al arreglo aleatorio de las fibras. El mayor porcentaje de área porosa se obtuvo en los andamios electrohilados con PLA: CoD (15:1) usando como disolvente de TFE/AC.

**Tabla 6. Área porosa de los andamios.**

<b>Andamio</b>	<b>% de área porosa</b>
<i>PLA/TFE</i>	56.5%
<i>PLA:TFE/AC</i>	62.00%
<i>PLA:CoD (30:1) TFE</i>	58.80%
<i>PLA:CoD (30:1) TFE/AC</i>	77.60%
<i>PLA:CoD (15:1) TFE</i>	57.50%
<i>PLA:CoD (15:1) TFE/AC</i>	78.50%

## Propiedades Mecánicas

Los andamios de la tabla 6 fueron sometidos a una prueba de tensión uniaxial. La prueba de tensión se realizó en la norma ASTM D1708. Se tomó en cuenta un total de 5 muestras por cada andamio. Con la prueba de tensión se obtuvo los valores de resistencia a la tensión y el módulo de Young que presentaron los andamios.

Los andamios elaborados de PLA disuelto en TFE presentó un esfuerzo a la tensión de  $3.71 \pm 0.39$  MPa y su valor del módulo de Young fue de  $93.8 \pm 14.6$  MPa. Por otra parte, los andamios de PLA disuelto en TFE/AC presentaron un esfuerzo a la tensión de  $2.11 \pm 0.37$  MPa y un módulo de Young de  $22.7 \pm 3.9$  MPa. Los valores de sus

propiedades mecánicas de los andamios de PLA en TFE/AC, al compararlo con los valores de los andamios de PLA disuelto en TFE, se notó una disminución en la resistencia a la tensión del 43.1 % y el módulo de Young disminuyó el 75.7%. De tal manera, la disminución de las propiedades mecánicas y la disminución de los diámetros de las fibras de los andamios, cuando se utilizó como disolvente el TFE/AC, se puede deber al efecto del ácido acético sobre la degradación del PLA.

Los andamios de PLA con CoD (30:1) disuelto en TFE presentó un esfuerzo a la tensión de  $1.51 \pm 0.36$  MPa y su módulo de Young fue de  $14.1 \pm 4.6$  MPa. El módulo de Young del andamio de PLA:CoD (30:1) en TFE disminuyó un 84.9%, comparada con el módulo de Young con un valor de 93.8 MPa, que corresponde al andamio de PLA/TFE (sin colágena de dentina de bovino).

Los valores del esfuerzo a la tensión de  $1.26 \pm 0.25$  MPa y el módulo de Young de  $10.6 \pm 3.2$  MPa corresponden a los andamios de PLA:CoD (30:1) en un sistema de disolventes (TFE/AC).

Los andamios de PLA:CoD (15:1) en TFE, tuvieron un módulo de Young de  $12.6 \pm 2.5$  MPa y una resistencia a la tensión de  $1.35 \pm 0.17$  MPa. El valor de resistencia a la tensión de este andamio fue similar al a los andamios de PLA:Col (30:1) en TFE/AC.

Los resultados de propiedades mecánicas de los andamios de PLA: CoD (15:1) en TFE/AC fueron los siguientes: esfuerzo a la tensión de  $1.18 \pm 0.23$  MPa y un módulo de Young de  $9.7 \pm 1.63$  MPa. En la Figura 35 se presentan los valores promedio de resistencia en tensión de los 6 diferentes andamios.

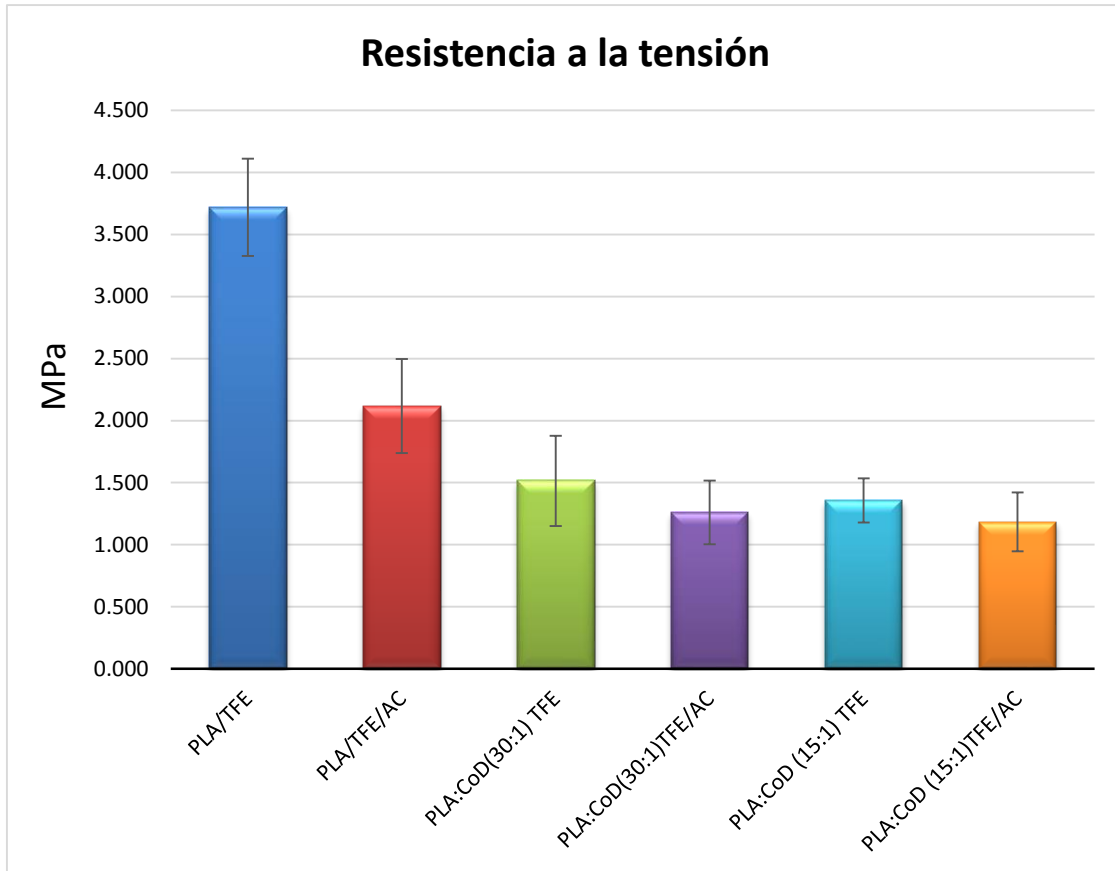


Figura 35. Gráfica de resistencia a la tensión de los andamios de PLA y PLA: CoD.

En la Figura 36 se observa una imagen de microscopía electrónica de barrido, del andamio de PLA en TFE/AC antes y después de la ruptura en la prueba de tensión uniaxial. Las fibras de los andamios se encuentran en una orientación aleatoria antes de la prueba en tensión, posterior a esta prueba sufrieron una alineación en dirección al esfuerzo aplicado y la ruptura de las fibras.

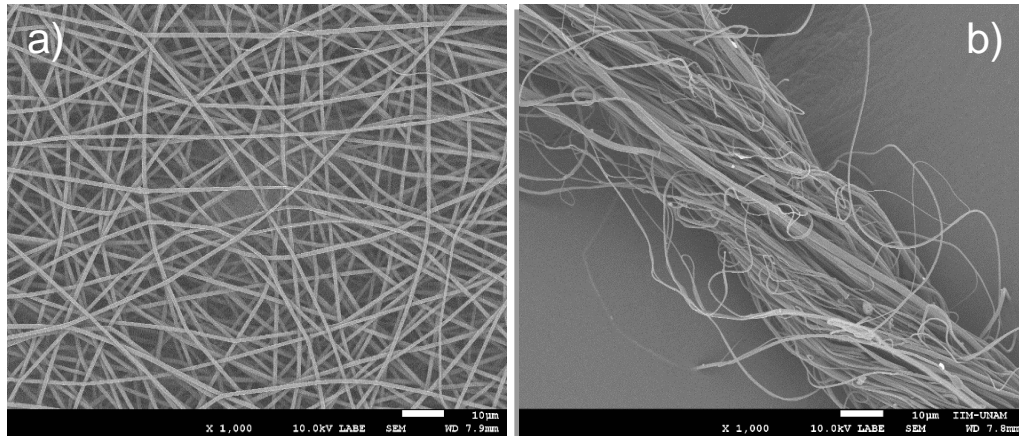


Figura 36. Imagen de SEM de andamios de PLA TFE/AC al 16% p/v, a) micrografía del andamio antes de la prueba en tensión, b) después de la prueba en tensión.

## Ángulo de Contacto

El PLA es un polímero biodegradable e hidrofóbico. En la literatura se menciona que los andamios electrohilados de PLA presentan un ángulo de contacto de  $140.75^\circ \pm 3.24^\circ$ . El ángulo de contacto de los andamios de PLA/TFE se midió en un goniómetro; se usó como muestra control para determinar cambios en las propiedades hidrofóbicas de los andamios a los cuales se les agregó colágena de dentina de bovino. En la Figura 37 se puede observar la imagen de la gota depositada en la superficie de la muestra del andamio de PLA/TFE. Se usó esta imagen y con la ayuda del *software Image J* se realizó la medición del ángulo de contacto.

El ángulo de contacto de los andamios de PLA/TFE fue de  $134^\circ \pm 3.7^\circ$  comparada con los andamios de PLA/TFE/AC, en donde se observó un ángulo de contacto de

$134^\circ \pm 5^\circ$ , por lo que prácticamente no hay un cambio considerable. Sin embargo, esto nos confirma que tenemos andamios hidrofóbicos de PLA.

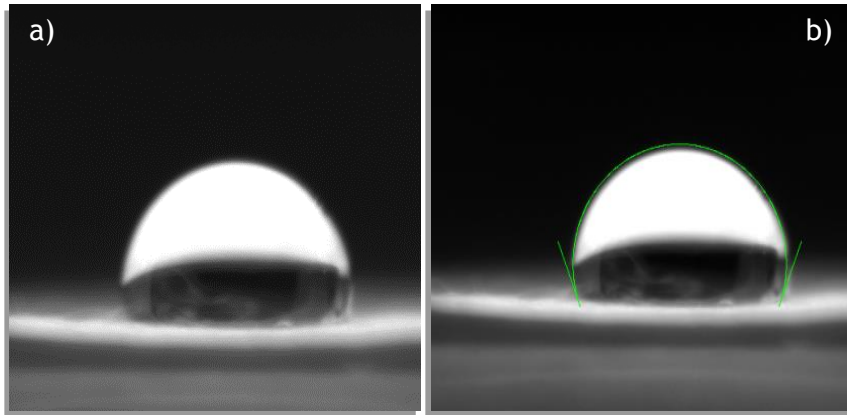


Figura 37. Ángulo de contacto, a) imagen de la gota depositada en el andamio de PLA: CoD 15:1 en TFE/AC, b) medición de ángulo de contacto sobre el andamio.

Los andamios electrohilados de PLA:CoD (30:1) en TFE y los andamios con el sistema de disolventes, tuvieron un ángulo de contacto de  $130^\circ \pm 3^\circ$  y de  $126^\circ \pm 1.9^\circ$  respectivamente. Este último ángulo de contacto comparado con el ángulo de contacto de los andamios de PLA presento un decremento de  $8^\circ$ .

Por último, las muestra de PLA:CoD (15:1) en TFE, presentaron un ángulo de contacto de  $124^\circ \pm 3.6^\circ$  mientras que los andamios obtenidos con la solución de PLA:CoD (15:1) en TFE/AC, presentó un ángulo de  $123^\circ \pm 2.3$ . Finalmente hay descenso de ángulo de contacto en los andamios de PLA:CoD. De estos resultados obtenidos se deduce que los andamios de PLA y PLA:CoD en TFE y TFE/AC presentaron un comportamiento hidrófobo. Sin embargo, el ángulo de contacto tiene una aparente disminución al agregar la colágena y el AC. Todos estos resultados se pueden observar en la gráfica de la Figura 38.

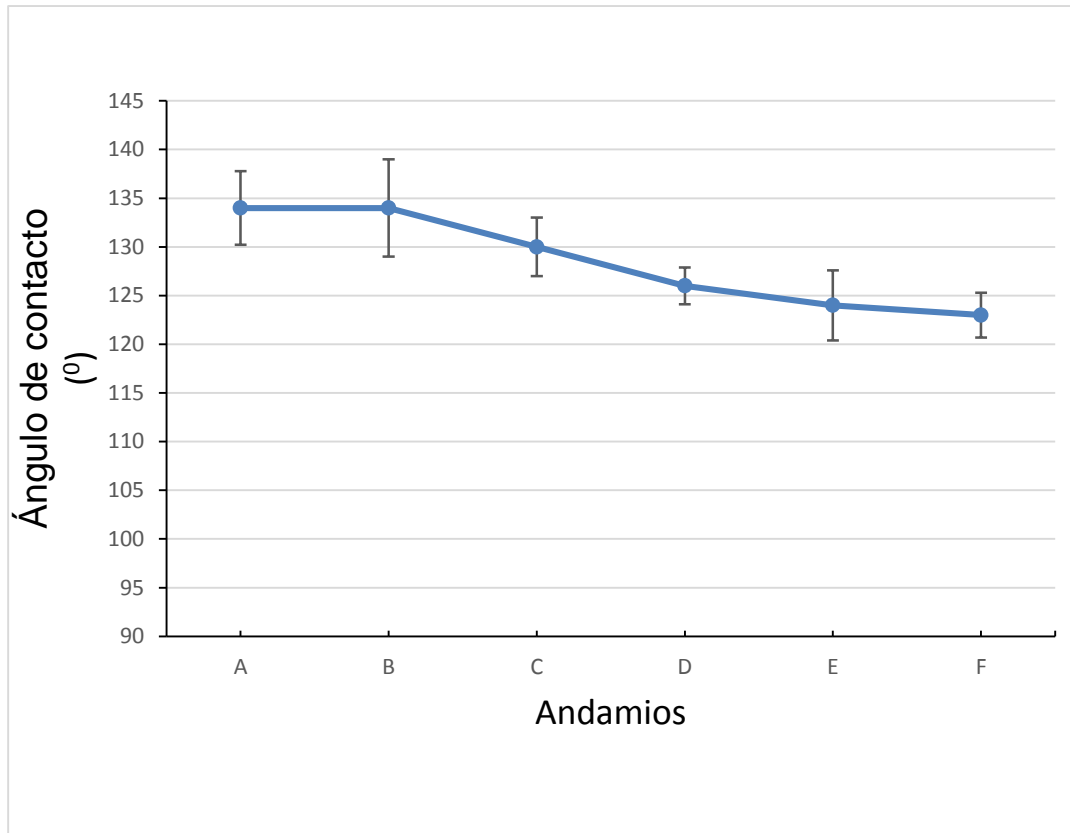


Figura 38. Gráfica de los ángulos de contactos de los andamios de PLA y PLA: CoD, A) PLA/TFE, B) PLA/TFE/AC, C) PLA:CoD (30:1) TFE, D) PLA:CoD (30:1) TFE/AC, E) PLA:CoD (15:1) TFE y F) PLA:CoD (15:1) TFE/AC.

## CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

### Discusión

En este estudio se obtuvieron andamios electrohilados de PLA con colágena de dentina de bovino, con un diámetro promedio de las fibras de 442 nm y un espacio libre de 78.5 %, con una resistencia a la tensión de 1.18 MPa.

Los andamios empleados para la ingeniería de tejidos deberían ser similares a la matriz extracelular en la composición tanto química como en las propiedades físicas del tejido a regenerar. En la actualidad se ha confirmado que el PLA es un polímero apto para la ingeniería de tejidos. Sin embargo, en el 2007, Jonathan B. Chui y colaboradores demostraron que la funcionalización de los andamios electrohilados de PLA con colágena presenta una mayor adhesión y migración que con los andamios de PLA puro. Por estos motivos se realizaron andamios electrohilados de PLA y colágena de dentina de bovino para su uso potencial en la regeneración de dentina.<sup>6</sup>

El método de Longin es un proceso de obtención de colágena a partir de huesos antiguos, que se utiliza en la arqueología para conseguir información del proceso evolutivo. El método consiste en la desmineralización del hueso para así obtener la colágena. Posteriormente se gelatiniza la proteína y se llevan a cabo los estudios de interés para la arqueología. En este trabajo, para obtener colágena a partir de dentina de bovino, se modificó el método de Longin.<sup>92</sup> Las variables que se cambiaron fueron el tiempo de desmineralización y el hecho de que no se gelatinizó la proteína. Este método fue adecuado para extraer la proteína de la dentina de bovino. El utilizar ácido



clorhídrico para obtener colágena de dentina de bovino fue adecuado porque se eliminó la materia inorgánica del tejido. Este resultado concuerda con el de Timothy y colaboradores quienes mencionan que el proceso en donde se utiliza ácido clorhídrico para extraer colágena es un método adecuado porque desmineraliza en su totalidad la materia inorgánica del hueso.<sup>104</sup> También se tiene una gran ventaja al utilizar HCl, según David Magne<sup>96</sup> y colaboradores, mencionan que este ácido elimina la mayor parte de proteínas no colágenas de la dentina.

El método de Longin modificado para obtener colágena de dentina de bovino presenta ventajas, comparado con el método de Ana Marina Ferreira y colaboradores. En este último trabajo se utilizó EDTA para desmineralizar materia inorgánica y obtener colágena, sin embargo este proceso tiene la desventaja de requerir 4 semanas para la desmineralización,<sup>104</sup> mientras que con el método realizado en este trabajo se utilizó menor tiempo, el cual fue de 72 horas. Por otra parte Zhongkai Zhang<sup>105</sup> utilizó ácido acético con tripsina para disolver la colágena y después empleó cloruro de sodio para precipitar la proteína. Bajo este proceso se tiene mayor rendimiento de extracción de proteína, comparado con el método que se utilizó en este trabajo. Sin embargo, el método de ZhongKai presenta desventajas debido a que la colágena obtenida mantiene el cloruro de sodio usado para precipitarla, a diferencia del método desarrollado en este trabajo, no hay presencia de Ca y P, provenientes del material inorgánico de la dentina de bovino, que es corroborado con el EDS.

La desnaturalización de la colágena corresponde a la pérdida de la triple hélice. Después de llevar a cabo el proceso de Longin con las modificaciones para obtener

colágena a partir de la dentina de bovino y caracterizarla por espectroscopia infrarroja, se busca identificar en qué estado se encuentra la colágena obtenida, puede ser colágena desnaturalizada, no desnaturalizada o colágena hidrolizada. En el espectro infrarrojo de la colágena de dentina se observan las bandas en 3300, 1631, 1539 y 1234  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a las amidas A, I, II y III, respectivamente, son bandas características de la colágena basándonos en la descripción de Ana María Ferreira<sup>104</sup> y colaboradores, ellos mencionaron que la colágena de hueso presentó bandas en 1633  $\text{cm}^{-1}$  y 1547  $\text{cm}^{-1}$  las cuales se relacionan con la amida I y la amida II, respectivamente. Cabe señalar que la amida I se encuentra asociada a la estructura de las cadenas  $\alpha$  de la colágena. La amida III se localiza en la banda correspondiente a 1238  $\text{cm}^{-1}$ , que pertenece al movimiento de estiramiento del enlace C-N.

La desnaturalización de la colágena se puede determinar por medio de espectroscopia infrarroja. Para comprobar si se encuentra desnaturalizada la colágena de dentina de bovino nos basamos en Plepis y colaboradores, quienes mencionan que la relación de la intensidad de absorbancia entre la banda correspondiente a la amida III y la de la banda de 1450  $\text{cm}^{-1}$ , debe dar la proporción de aproximadamente 1.0, lo que indica que la colágena presenta su estructura tripe hélice.<sup>99</sup> Se realizó esta relación con la colágena de dentina de bovino, entre las alturas de absorbancia de la banda a 1234 y 1450  $\text{cm}^{-1}$  y como resultado presentaron una relación de 1.0, lo que de acuerdo a la literatura citada, significa que la CoD no se encuentra desnaturalizada.

La colágena obtenida a partir de dentina de bovino como la colágena comercial se encuentran sin hidrolisis, esto debido o que ambas presentan la ausencia de la banda

a  $1725\text{ cm}^{-1}$  que aparece cuando ocurre la hidrólisis de esta proteína, de acuerdo a los resultados de F. Maspero.<sup>92</sup>

Como se demostró en el espectro infrarrojo de la colágena de dentina de bovino, está no se encuentra desnaturalizada. Este resultado se reforzó con los termogramas del estudio de calorimetría diferencial de barrido y de termogavimetría. Los termogramas del DSC de la colágena de dentina presentan una temperatura de desnaturalización de  $226\text{ }^{\circ}\text{C}$  y la colágena de piel de becerro tiene una temperatura de desnaturalización de  $217\text{ }^{\circ}\text{C}$  estos resultados son de acuerdo a Lozano LF y colaboradores, quienes describen el termograma del DSC de la colágena de tendón de bovino: con dos picos endotérmicos, uno a  $90^{\circ}\text{C}$ , correspondiente a la evaporación del agua y en  $220\text{ }^{\circ}\text{C}$  el cual se le atribuye a la desnaturalización de la colágena.<sup>99</sup> Respecto a esta diferencia en las temperaturas de desnaturalización, de acuerdo con al trabajo de Ana Marina Ferreira y colaboradores, mencionan que la temperatura de desnaturalización en el termograma de DSC puede variar de  $60$  a  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ , lo cual depende de la cantidad de agua y la presencia de otras moléculas sobre la estructura de la colágena. En un estudio, el resultado del análisis realizado por TGA de la colágena de tendón de bovino mostró una pérdida de masa alrededor de  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ , que corresponde a la evaporación del agua y, posteriormente, a partir de los  $220^{\circ}\text{C}$  empieza la mayor parte de pérdida de masa, esto se debe a la descomposición de la proteína. El termograma de TGA de la colágena de dentina presenta las dos perdidas de masa: una pérdida de masa alrededor de los  $150^{\circ}\text{C}$  y otra a partir de los  $227\text{ }^{\circ}\text{C}$ , que corresponde a la evaporación de agua y a la desnaturalización, como la marca la literatura.

Para la fabricación de los andamios se utilizó la técnica del electrohilado, puesto que es eficaz para realizar andamios con fibras de diferentes polímeros, andamios con fibras alineadas o aleatorias, además de ser una técnica en donde es posible controlar el diámetro de las fibras. Los factores que controlan el diámetro y la morfología de las fibras de los andamios electrohilados se dividen en dos grupos: parámetros del sistema y parámetros del proceso. Los parámetros del sistema involucran la concentración de la solución, el tipo de disolvente a utilizar, la conductividad de la solución y la viscosidad. Los parámetros del sistema son: el flujo de inyección de la solución polimérica, la distancia entre la aguja y el colector y el voltaje aplicado. La concentración del polímero en el disolvente afectó los diámetros de las fibras: a mayor concentración, el diámetro de las fibras fue mayor. Este comportamiento se observó en nuestros andamios electrohilados de PLA al 16% en TFE, ya que presentan un mayor diámetro, comparadas con los andamios de PLA al 13 % en TFE. Se puede explicar este fenómeno debido a que las soluciones con menor concentración de PLA tienen mayor cantidad de disolvente, por lo tanto tarda más tiempo para que se solidifique el chorro del electrohilado y de esta manera el chorro se alarga y se adelgaza con el tiempo y así fibras se forman con diámetros más delgados. Cuando la concentración de PLA es mayor, la fracción de disolvente es menor, por lo cual el chorro del electrohilado se solidifica más rápido y se forman fibras más gruesas. Se puede comparar este comportamiento con los resultados de Huang Zheng y colaboradores, que al electrohilar gelatina, proteína derivada de la colágena, a una concentración del 5%, 7.5% 10 %,12.5 y 15 % en TFE aumentan los diámetros promedios de las fibras al aumentar la concentración.<sup>106</sup>

Molamma P y colaboradores demostraron que el PLLA se puede electrohilar con 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (TFP) a una concentración del 16% (p/v), con un voltaje de 10 kV y a una distancia de la salida de la solución del polímero de la aguja hacia el colector de 15 cm, ellos obtuvieron fibras de  $860 \pm 110$  nm.<sup>4</sup> En este trabajo se obtuvieron andamios electrohilados de PLA bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas y se obtuvieron andamios con fibras de  $813 \pm 351$  nm, aunque se observó una mayor desviación estándar respecto al trabajo anterior. Esto se lo atribuimos a la diferencia de disolvente utilizado, porque la selección de disolventes es una variable del proceso del electrohilado que afecta la morfología de las fibras. Este efecto del disolvente se observa claramente al electrohilar el PLA al 16%, en donde se utilizó una distancia de 25 cm y un voltaje de 10 kV. Se observa que al emplear como disolvente el TFE se obtuvo diámetros de fibras de  $943 \pm 243$  nm, comparadas con las fibras de menor diámetro de  $853 \pm 126$  nm en donde se utilizó la mezcla de disolventes de TFE/AC.

El voltaje es una variable que se buscó optimizar para obtener menor diámetro de fibras de los andamios de PLA. Se dejó constantes los demás parámetros. Al electrohilar PLA al 13 % en TFE a tres voltajes 10, 13 y 20 kV, se observó que, conforme se aumenta el voltaje, la desviación estándar de los diámetros promedio de las fibras se incrementa notablemente. De la misma manera en el trabajo de Youg lui y colaboradores, afirman que al aumentar el voltaje en el proceso del electrohilado se forman varios chorros de diferentes diámetros, de la solución polimérica<sup>107</sup> lo que provoca aumento en el diámetro y la desviación estándar de las fibras, mientras que

al realizar el electrohilado con un voltaje menor se forman menores chorros de la solución polimérica.

En los andamios de PLA con colágena de dentina de bovino se observó que la colágena disminuye los diámetros promedio de las fibras, porque cuando se obtuvieron andamios electrohilados de PLA al 16 % en TFE/AC (25 cm y 10 kV), se observó una disminución en el diámetro promedio de las fibras de aproximadamente 500 nm al comparar con las fibras de los andamios de PLA: CoD al 16% (15:1) en TFE/AC (25 cm y 10 kV). La disminución del diámetro de las fibras al agregar la colágena se comprueba en el estudio de Rajeswari Ravichandran y colaboradores (en el 2012) quienes encontraron que al electrohilar PLA con Poli-( $\alpha,\beta$ )-DL-aspartico y colágena tipo I y III disminuye el diámetro de las fibras cuando hay presencia de la proteína, en comparación con andamios de solo PLA.<sup>108</sup>

El comportamiento de los diámetros promedio de las fibras de PLA y PLA: CoD en función de la distancia entre la aguja y el colector depende de la concentración de la solución polimérica. Con la solución de PLA: CoD al 16% (30:1) TFE se observó que la distancia adecuada para obtener menores diámetros de fibras es a 15 cm, a 10 kV con un flujo de inyección de 0.4 mL/hr, mientras que al realizar electrohilados de PLA: CoD 16 % (15:1), se observó que la distancia adecuada para tener menores diámetros es de 25 cm, con el mismo voltaje y flujo de inyección.

En el ensayo de tensión se observó la disminución de las propiedades mecánicas de los andamios que contienen colágena comparados con los andamios de solo PLA. Esto se debe a que la colágena presenta propiedades mecánicas pobres comparadas con las del PLA.

## Conclusiones

- Se elaboraron andamios electrohilados de PLA con colágena de dentina de bovino con diámetros mayores 442 nm, con una resistencia a la tensión menor a 1.1 MPa, un área porosa de 78.5 % y con morfología apropiadas para su uso en la ingeniería de tejidos en el área de la odontología
- El método de Longin, con modificaciones en el tiempo de los lavados, donde se usa ácido clorhídrico a 0.6 molar para eliminar la materia inorgánica, es adecuado para la obtención de colágena de dentina de bovino.
- Las condiciones óptimas para obtener las fibras de los andamios con tales características de PLA con colágena de dentina de bovino, en una proporción de 15:1 con respecto al PLA y a una concentración final de la solución del 16%, se debe utilizar un sistema de disolvente de TFE y ácido acético y electrohilar con una velocidad de inyección de 0.4 mL/hr, con un voltaje de 10 kV y una distancia de la aguja hacia el colector de 25 cm.
- El tipo de disolvente utilizado es un parámetro determinante para el proceso del electrohilado, debido a que afecta directamente el diámetro de las fibras electrohiladas.

- La colágena es una proteína que influye considerablemente en las propiedades físicas de los andamios, ya que disminuye las propiedades mecánicas y el diámetro de las fibras.



## **Perspectiva**

- ❖ Se recomienda realizar microscopía de fluorescencia en las fibras de los andamios de PLA con colágena de dentina de bovino para determinar la distribución de la colágena sobre las fibras.
  
- ❖ Se propone realizar crecimiento de células troncales de la pulpa dental sobre los andamios de PLA con colágena de dentina de bovino, para determinar la biocompatibilidad de los andamios.

## REFERENCIAS

1. Moioli EK, Clarck PA, Xin X, Lal S, Mao J. Matrices and scaffolds for drug delivery in dental, oral and craniofacial tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 4(5): 308-324.
2. Werner C, editor. *Polymers for regenerative medicine* Berlin: Springer Verlag 2006. p. 217.
3. Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59(14): 1413-1433.
4. Molamma PP, Venugopal J, Ramakrishna S. Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. 2009; 5(8): 2884-2893.
5. Matthew JF, Gary EW. Electrospun collagen and its applications in regenerative medicine. *Drug Delivery and Translational Research.* 2012; 2(5):313-322.
6. Chiu JB, Lui C, Hsiao BS, Chu B, Hadjiargyrou M. Functionalization of poly(L-lactide) nanofibrous scaffolds with bioactive collagen molecules. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 83(4): 1117-1127.
7. Kijeńska E, Prabhakaran MP, Swieszkowski W, Kurzydłowski KJ, Ramakrishna S. Electrospun bio-composite P(LLA-CL)/collagen I/collagen III scaffolds for nerve tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012; 100(4):1093-1102.
8. Chandrhasa S, Murray PE, Namerow KN. Proliferation of mature ex vivo human dental pulp using tissue engineering scaffolds. *J Endod.* 2011; 37(9): 1236-1239.
9. Boccaccini RA, Gough EJ, editor. *Tissue engineering using ceramics and polymers* Nort America: CRC Press 2007. p. 270-293.
10. Vasita R, Katti DS. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int J Nanomedicine.* 2006; 1(1): 15-30.

11. Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti BN, Nör JE.. Tissue engineering: from research to dental clinics. *Dent Mater.* 2012; 28(4): 341-348.
12. Laurencin CT, Nair LS, editor. *Nanotechnology and tissue engineering U.S:* CRC Press 2008. p. 4-190.
13. Paul K C, Xuanyoung L, editor. *Biomaterials Fabrication and Processing Handbook* New York: CRC. Press 2008. p 720.
14. Misako N, Akifumi A. The Application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *Journal of Endodontics.* 2005; 31(10): 711-718.
15. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative Endodontics: A Review of Current Status. *J Endod.* 2007; 33(4): 377-390.
16. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004; 116(5): 639-648.
17. Nakao K, Tsuji T. Dental regenerative therapy: Stem cell transplantation and bioengineered tooth replacement. *Japanese Dental Sci Rev.* 2013; 44(1): 70-75.
18. Tom E, Bard J. Collagen Substrata for studies on cell behavior. 1997; 54(3): 626-637.
19. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(2):184-198.
20. Smith L.A, Ma PX . Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2004; 39(3): 125-131.
21. Su Y, Su Q, Liu W, Lim M, Venugopal JR, Mo X, Ramakrishna S, Al-Deyab SS, El-Newehy M. Controlled release of bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone loaded in core-shell PLLACL-collagen fibers for use in bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2012 ; 8(2): 763-771.
22. Ji W, Sun Y, Yang F, van den Beucken JJ, Fan M, Chen Z, Jansen JA. Bioactive electrospun scaffolds delivering growth factors and genes for tissue engineering applications. *Pharm Res.* 2011; 28(6):1259-1272.
23. Liu M1, Liu N, Zang R, Li Y, Yang ST. Engineering stem cell niches in bioreactors. *World J Stem Cells.* 2013; 5(4):124-135.

24. Michael H. Ross, Wojciech Pawlina. Histología texto y atlas color con biología celular y molecular. 5th ed. E.U: Medica panamericana 2007. p. 974.
25. Gary E.W, Gary L.B, editor. Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering. 2nd ed. New York : Informa Healthcare USA 2008.
26. Daley, WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular Matrix Dynamics in Development and Regenerative Medicine. J. Cell. Sci. 2008; 121: 255–264.
27. Diamond M, Anatomia dental México Ed. Limusa 2009. p. 505.
28. [En línea] Disponibilidad:  
([https://www.google.com.mx/search?q=estructura+dental&hl=es&rlz=1T4RLTA\\_esMX573MX576&source=Inms&tbn=isch&sa=X&ei=q1\\_iU6rels\\_qoATxooKABw&ved=0CAgQ\\_AUoAQ&biw=1051&bih=501#hl=es&q=estructura+anatomica+de+un+diente&tbn=isch&facrc=\\_&imgdii=\\_&imgrc=GbCg8ijgxf](https://www.google.com.mx/search?q=estructura+dental&hl=es&rlz=1T4RLTA_esMX573MX576&source=Inms&tbn=isch&sa=X&ei=q1_iU6rels_qoATxooKABw&ved=0CAgQ_AUoAQ&biw=1051&bih=501#hl=es&q=estructura+anatomica+de+un+diente&tbn=isch&facrc=_&imgdii=_&imgrc=GbCg8ijgxf)).
29. Hargreaves KM, Goodis HE editor. Seltzer and Bender's Dental Pulp Chicago: Quintessence books 2002. p. 500.
30. Avery JK, Daniel J. Chiego Chiego J. Essentials of oral histology and embryology: a clinical approach. 3<sup>rd</sup> ed. Madrid: Elsevier 2007. p. 242.
31. Ferraris MEG, Muñoz AC. Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental. 3<sup>rd</sup> ed. Madrid España: Medica panamericana 2009. p. 446.
32. Marshall WG, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. J of Dentistry. 1997; 25(6): 441-448.
33. Posada MC, Sánchez CF, Gallego GJ, Vargas AP, Restrepo LF, López JD Dientes de bovino como sustituto de dientes humanos para su uso en la odontología. Rev CES Odontología. 2006; 19(1): 63-68.
34. Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. J Endod. 2007; 33(4): 422-426.
35. Sanol H, Ciucchi B, Matthews WG, Pashley DH. Tensile properties of mineralized and demineralized human and bovine dentin. J Dent Res. 1994; 7(6): 1205-1211.

36. Patino G. M, Neiders E. M, Andreana S, Noble B, Cohen E. R. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. *Journal of Oral Implantology*. 2002; 28(5): 220-225.
38. Fratzl P, editor. *Collagen: structure and mechanics* New York: Elsevier 2012. p. 506.
39. Maynes ER, Burgenso R, editor. *Structure and function of Collagen types* Orlando Florida: Academic Press Inc 1987. p. 317.
40. Brinckman J, Notbothm H, Müller PK, editor. *Collagen: primer in structure processing and assembly* Berlin: Springer 2005. p. 1-20.
41. Bruce A. *Introducción a la biología celular*. 2nd ed. Buenos Aires: Panamericana 2006. p. 864.
42. [En línea] Disponibilidad:  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2846778/>, s.f.).
43. Auras R, Lim LT, Selke SE, Tsuji H, editor. *Poly(lactic acid)* New Jersey: Wiley 2010. p. 801.
44. Pinzón JE, Martínez JH, Espinosa A, Pérez A, Narváez PC. Polimerización de ácido DL láctico mediante policondensación por fusión directa. Estudio cinético de la etapa de oligomerización. *Rev Colombiana de Quim*. 2006; 35(2): 125.
45. H Hartman. *High molecular weight polylactic acid polymers*. Berlin: Biopolymers from Renewable Resources, Springer -Verlang 1998. p. 367-411.
46. [En líena] Disponible:  
([https://www.google.com.mx/search?q=poli+acido+lactico&hl=es-MX&rlz=1T4RLTA\\_esMX573MX576&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=VG\\_iU\\_2tOsrhoASTnIHQCA&sqi=2&ved=0CDMQsAQ&biw=1051&bih=501#facrc=\\_&imgdii=\\_&imgrc=ysw70uv4-0\\_gqM%253A%3BUBiPVBsm6bQs3M%3Bhttp%253A%](https://www.google.com.mx/search?q=poli+acido+lactico&hl=es-MX&rlz=1T4RLTA_esMX573MX576&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=VG_iU_2tOsrhoASTnIHQCA&sqi=2&ved=0CDMQsAQ&biw=1051&bih=501#facrc=_&imgdii=_&imgrc=ysw70uv4-0_gqM%253A%3BUBiPVBsm6bQs3M%3Bhttp%253A%)).
47. Kaihara S, Matsumura S, Mikos AG, Fisher J P. Synthesis of poly(L-lactide) and polyglycolide by ring-opening polymerization. *Nature protocols*. 2007; 2: 2767-2771.

48. Báez EJ. Cómo obtener un polímero degradable en el laboratorio: síntesis de la poli(d,l-lactida) y caracterización por RMN 1H. *Educ. Quím.* 2010; 21(2): 170-177.
49. Donald G. A literature review of poly(lactic acid). *J Poly and the Environ.* 2001; 9(2): 63-84.
50. Weir NA, Buchanan FJ, Orr JF, Farrar DF, Dickson GR. Degradation of poly-L-lactide. Part 2: Increased temperature accelerated degradation. *Proc Inst Mech Eng H J Eng Med.* 2004; 218(5): 321-330.
51. Wise DL, Trantolo DJ, Gresser J D, Yaszemski MJ, Altobelli DE. Lewandrowski K-U editor. *Tissue engineering and biodegradable equivalents scientific and clinical applications.* In. New York: Marcel Dekker Inc 2002. p. 811.
52. Serna CL, Rodríguez de S A, Albán AF. Ácido Poliláctico (PLA): propiedades y aplicaciones. *Ingeniería y Competitividad.* 2003 Octubre; 5(1): p. 16-26.
53. Andrady AL. *Science and technology of polymer nanofibers USA:* Wyler; 2008. p.209-210.
54. Kyriacos A A, Gabriele GN, Mauli A. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials.* 1996; 17(2): 93-102.
55. Weir NA, Buchanan FJ, Orr JF, Dickson GR. Degradation of poly-L-lactide: Part 1: in vitro and in vivo physiological temperature degradation. *Proc Inst Mech Eng H J Eng Med.* 2004; 1: 307-319.
56. Peter MX. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today.* 2004; 7(5): 30-40.
57. Yang F, Murugan R, Wang S, Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials.* 2005 May; 15: 2603-2610.
58. Deng XL, Sui G, Zhao ML, Chen GQ, Yang XP. Poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite hybrid nanofibrous scaffolds prepared by electrospinning. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2007; 18(1): 117-130.

59. Chiu JB, Liu C, Hsiao BS, Chu B, Hadjiargyrou M. Functionalization of poly(L-lactide) nanofibrous scaffolds with bioactive collagen molecules. *J Biomed Mater Res A*. 2007 ; 83(4): 1117-1127.
60. Schofer MD, Veltum A, Theisen C, Chen F, Agarwal S, Fuchs-Winkelmann S, Paletta JR. Functionalisation of PLLA nanofiber scaffolds using a possible cooperative effect between collagen type I and BMP-2: impact on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2011; 22(7): 1753-1762.
61. Andric T, Wright LD, Taylor BL, Freeman JW. Fabrication and characterization of three-dimensional electrospun scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2012; 100 A(8): 2096-2105.
62. Tucka JS, Leacha KM, Feng ZQ, Corey JM. Critical variables in the alignment of electrospun PLLA nanofibers. *Mater Sci Eng C*. 2012; 32(7): 1779-1784.
63. Yu Q Z, Qin M Y. Fabrication and formation mechanism of poly(L-lactic acid) ultrafine multi-porous hollow fiber by electrospinning. *eXPRESS Polym Lett*. 2013; 7(1): 55-62.
64. Wang BY, Fu SZ, Ni PY, Peng JR, Zheng L, Luo F, Liu H, Qian ZY. Electrospun polylactide/poly(ethylene glycol) hybrid fibrous scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2012; 100 A(2): 441-449.
65. Meng ZX, Zheng W , Zheng YF. Recent advance in electrospinning nanofibers for biomedical engineering. <http://www.paper.edu.cn>: 1-12.
66. Karthikeyan S, Waqar A, Hartsfield Jk. *Nanobiomaterials in clinical dentistry USA*: Elsevier 2013. p. 519
67. Ramakrishna S, Fujihara K, Teo W-E, Lim T-C, Ma Z. *An introduction to electrospinning and nanofibers* Singapore: World Scientific Publishing; 2005. p. 382.
68. Baji A, Mai Y-W, Wong S-C, Abtahi M, Chen P. Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Compos Sci Technol*. 2010 May; 70(5): 703-718.
69. Thompson C.J, Chase G.G, Yarin A.L, Reneker D.H. Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer*. 2007; 48(23): 6913e-6922e.

70. Casper CL, Stephens SJ , Tassi NG , Chase DB, Rabolt JF. Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. *Molecules*. 2004; 37(2): 573-578.
71. M.A., Hayat, editor. Principles and techniques of scanning electron. Van Nostrand Reinhold. 1974: p. 273.
72. V.A, Alonso, editor. editor. Electroquímica y electrocátalisis técnicas de investigación aplicada a sistemas electroquímicos en situ y ex situ Buenos Aires; 2003. p. 254
73. Alatorre AJ. Contribuciones de la Física en la Historia de la Microscopía. *Revista digital Universitaria*. 2005; 6: 1-10.
74. González M. G, Noguez A. M.E. Principios de microscopía electrónica de barrido y microanálisis por rayos X característicos. UNAM, Fac de Quím. 2006: 97.
75. Murr Lawrence E. Electron and Ion Microscopy and Microanalysis : Principles and. *J of Modern Optics*. 1993; 40(6):
76. Setlee Frank A. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry New Jersey: Upper Saddle River; 1997. p. 249-260.
77. John.P S, editor. A guide to materials characterization and chemical analysis. 2nd ed. USA: Wiley-VCH; 1996. p. 17-27.
78. Sibilia JP. A Guide to Materials Characterization and Chemical Analysis New York: Wiley/VCH; 1997. p. 388.
79. [En línea] Disponibilidad:  
[www.ehu.es/imacris/PIE06/web/IR.htm](http://www.ehu.es/imacris/PIE06/web/IR.htm), s.f.). [Online].
80. Stuart B. Infrared Spectroscopy. Published Online. 2005; 5(1): 10-25.
81. Tonomura A, Mizuno D, Hisada A, Kuno N, Ando Y, Sumita Y, Honda MJ, Satomura K, Sakurai H, Ueda M, Kagami H. Differential effect of scaffold shape on dentin regeneration. *Ann Biomed Eng*. 2010; 38(4): 1664-16671.
82. Kim NR, Lee DH, Chung PH, Yang HC. Distinct differentiation properties of human dental pulp cells on collagen, gelatin, and chitosan scaffolds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 108(5):96-100.



83. Patino MG, Neiders ME, Andreana S, Noble B, Cohen RE. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. *J Oral Implantology*. 2002; 28(5): 220-225.
84. ISO/TS 11405:2003 E Materiales Dentales- Prueba de adhesión en estructura de diente. 2003-01-20. ISO/TC 106/SC 1, 11.060.10.
85. Caputo I, Lapretti M, Sacarabino C, Esposito C, Proto A. An acetic acid-based extraction method to obtain high quality collagen from archeological bone remains. *Anal Biochem*. 2012; 421(1): 92-96.
86. Ospina O A. Obtención y caracterización de nanofibras de poli(ácido láctico) modificado con colágena mediante la técnica de electrohilado. México D.F: Tesis Ciencia e Ingeniería de Materiales UNAM; 2011.
87. ASTM D1078. Standard test method for tensile properties of plastics by use of microtensile specimens.
88. Bhattarai SR, Bhattarai N, Viswanathamurthi P, Yi HK, Hwang PH, Kim HY. Hydrophilic nanofibrous structure of polylactide; fabrication and cell affinity. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 78(2): 243-257.
89. Bachmann L, Diebold R, Hibst R, Zetzl D.M. Infrared Absorption Bands of Enamel and Dentin Tissues from Human and Bovine Teeth. *Applied Spectroscopy Rev*. 2003; 38(1): 1-14.
90. Elkayar A, Elshazly Y, Assaad M. Properties of Hydroxyapatite from Bovine Teeth. *Bone and Tiss Reg Insights*. 2009; 2(3): 31-36.
91. LeGeros L.Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci*. 1991; 15: 1-201.
92. Maspero F, Sala S, Fedi ME, Martini M, Papagni A. A new procedure for extraction of collagen from modern and archaeological bones for <sup>14</sup>C dating. *Anal Bioanal Chem*. 2011; 401(6): 2019-2023.
93. Eckel R, Huo H, Guan H-W, Hu Xiang, Che Xun, Huang W-D. Characteristic infrared spectroscopic patterns in the protein bands of human breast cancer tissue. *Vibra Spectros*. 2001 December; 27(2): 165-173.
94. Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*. 2004; 85(1): 81-89.

95. Kamińska A, Sionkowska A. Effect of UV radiation on the infrared spectra of collagen. *Polym Degrad Stab.* 1996; 51(1): 19-26.
96. Magne D, Weiss P, Bouler JM, Laboux O, Daculsi G. Study of the maturation of the organic (type I collagen) and mineral (nonstoichiometric apatite) constituents of a calcified tissue (dentin) as a function of location: a Fourier transform infrared microspectroscopic investigation. *J Bone Miner Res.* 2001; 16(4): 750-757.
97. Liua D, Liang L, Regenstein J.M , Zhou P. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry.* 2012; 133(4): 1441-1448.
98. Ahmad M, Benjakul S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Chemis.* 2010; 120(3): 817-824.
99. Lozano LF, Ocotlan JF, Gómez CA, Vázquez R, Belío IA, Bucio L. Thermal analysis study of human bone. *J Mater Sci.* 2003; 38: 4777-4785.
100. PietruchaK. Changes in denaturation and rheological properties of collagen–hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependencies. *Int J of Biol Macromolecules.* 2005; 36(5): 299-304.
101. Miles C.A, Ghelashvili M. Polymer-in-a-box mechanism for the thermal stabilization of collagen. *Biophysical J.* 1999; 79(6): 3243–3252.
102. Frenot A, Chronakis I.S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 2013; 8: 64-75.
103. Ravichandran R, Venugopal JR, Sundarrajan S, Mukherjee S, Sridhar R, Ramakrishna S. Composite poly-L-lactic acid/poly-( $\alpha,\beta$ )-DL-aspartic acid/collagen nanofibrous scaffolds for dermal tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2012; 32(6): 1443-1451.
104. Ferreira AM, Gentile P, Sartori S, Pagliano C, Cabrele C, Chiono V, Ciardelli G. Biomimetic soluble collagen purified from bones. *Biotechnol J.* 2012; 7(11): 1386–1394.

105. Zhang Z, Liu W, Li D, Li G. Physicochemical properties of succinylated calfskin pepsin-solubilized collagen. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007 August; 71(8): 2057-2060.
106. Huang Z M, Zhang Y Z, Ramakrishna S, Lim C T. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. *Polymer*. 2004; 45(15): 5361-5368.
107. Yuan J, Cui Lei, Zhang W J, Liu W, Coa Y. Effect of applied voltage on diameter and morphology of ultrafine fibers in bubble electrospinning. *J Appl Polym Sci*. 2011; 120(1): 592-598.
108. Ravichandran R, Venugopal JR, Sundarrajan S, Mukherjee S, Sridhar R, Ramakrishna S. Composite poly-L-lactic acid/poly-( $\alpha,\beta$ )-DL-aspartic acid/collagen nanofibrous scaffolds for dermal tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2012; 32(6): 1443-1451.