



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

BIOCOMPATIBILIDAD DE FIBROBLASTOS DERIVADOS
DE LIGAMENTO PERIODONTAL EXPUESTOS A
MEMBRANAS DE POLICAPROLACTONA CON
TETRACICLINA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
IRICZALLI CRUZ MAYA

TUTOR:
Dr. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2015



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 por darme la oportunidad de superación académica y ser siempre mi segunda casa.

Al Dr. Marco por abrirme las puertas, acercarme a la investigación científica, su apoyo y paciencia para guiarme durante mis estudios de maestría y ser una persona siempre dispuesta a brindar su tiempo.

A la Dra. Argelia, por el conocimiento, opinión, observaciones y apoyo en este proyecto.

A los miembros del jurado quienes se tomaron el tiempo para leer y, hacer observaciones a este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, por siempre tener la frase adecuada y buenos momentos que nunca faltaron, así como lo que me han enseñado y su ayuda.

Al Dr. Fernando Suaste Olmos por la asesoría, así como el importante y excelente apoyo técnico.

A Anita por la paciencia y apoyo en todos los trámites administrativos.

Se agradece el apoyo por parte de DGAPA-UNAM: PAPIIT IN213912, PAPIIT IN210815 para la realización de este proyecto.

A CONACyT, por el apoyo económico con número becario: 299438 para mis estudios de maestría.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Generalidades de tejido periodontal	3
1.2 Enfermedad periodontal	6
1.3 Terapia periodontal	9
1.4 Uso de la tetraciclina como adyuvante en la Terapia Periodontal	12
1.5 Bioingeniería de tejidos	15
1.5.1 Técnica de electrospinning	17
1.5.2 Técnica de electrospray	21
1.5.3 Materiales poliméricos utilizados en la bioingeniería de tejidos y liberación de fármacos	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos específicos	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1 Diseño de los andamios de PCL con nanopartículas de quitosano con tetraciclina	28
5.2 Ensayos biológicos	28
5.2.1 Cultivo celular	28
5.2.2 Ensayo de adhesión celular	29
5.2.3 Ensayo de viabilidad celular (citotoxicidad)	29

5.2.4 Ensayos de actividad antimicrobiana	30
5.3 Análisis estadístico	32
6. RESULTADOS	33
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIONES	41
9. REFERENCIAS	42
10. ANEXO A	50

RESUMEN

La enfermedad periodontal es una de las enfermedades más comunes en adultos y consiste en una inflamación causada por la acumulación de bacterias, lo cual afecta los tejidos de soporte del diente. La gingivitis es una inflamación reversible de la encía por acumulación de placa dentobacteriana. Cuando la gingivitis no es tratada adecuadamente, y el proceso inflamatorio persiste, la enfermedad progresa convirtiéndose en periodontitis, causando la pérdida de los tejidos que conforman el periodonto. Una de las medidas a seguir para reducir los agentes irritantes y controlar la infección es el raspado y alisado radicular, así como la administración de antibióticos sistémicos o locales como coadyuvante al tratamiento de regeneración tisular guiada. La ingeniería de tejidos y la liberación de fármacos están ampliamente relacionados y se ha buscado en el campo de las nanociencias el desarrollo de sistemas que puedan integrar ambos campos. Recientemente se ha propuesto el uso simultáneo de la técnica de electrospinning y electrospraying, para el diseño de andamios híbridos, los cuales sean capaces de guiar la respuesta celular, así como liberar moléculas, ya sea proteínas, factores de crecimiento o antibióticos, para favorecer la regeneración de los tejidos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la respuesta biológica con fibroblastos derivados de ligamento periodontal y la actividad antimicrobiana con *E. coli*, *S. aureus* y *A.actinomycetemcomitans* de las membranas co-electrohiladas de PCL/quitosano con diferentes concentraciones de clorhidrato de tetraciclina. Los resultados indican que los andamios co-electrohilados con tetraciclina favorecen la adhesión celular y que las concentraciones de clorhidrato de tetraciclina no son tóxicas para las células. La tetraciclina liberada de los andamios co-electrohilados mostró tener actividad antimicrobiana, por lo que estos andamios podrían ser utilizados en la terapia periodontal.

ABSTRACT

Periodontal disease is one of the most common diseases in adults, is an inflammation caused by the accumulation of bacteria, which affects the supporting tissues of the tooth. Gingivitis is a reversible inflammation of the gums due to accumulation of micro-organisms. When gingivitis is not treated suitably, and the inflammatory process persists, the disease progresses to periodontitis causing loss of tissue that form the periodontium. The conventional treatment involve scaling and root planning, as well the administration of systemic or local antibiotics as adjunct to treatment of guided tissue regeneration. Tissue engineering and drug delivery are broadly related and has been sought in the field of nanoscience the development of systems that can integrate both fields. It has recently been proposed the simultaneous use of the technique of electrospinning and electrospraying, to design hybrid scaffolds, which are capable of guiding cellular response and release molecules either proteins, growth factors or antibiotics, to promote tissue regeneration. The objective of this study was to characterize the biological response of periodontal ligament fibroblasts and antimicrobial activity with *E. coli*, *S. aureus* and *A. actinomycetemcomitans* of co-electrospun scaffolds of PCL/chitosan with different concentrations of tetracycline hydrochloride. The results indicate that the co-electrospun scaffolds promote cell adhesion and that concentrations of tetracycline are not toxic to cells. Tetracycline release from co-electrospun scaffolds had antimicrobial activity, which is an advantage in the treatment of periodontal disease. Hence, these scaffolds may be used in periodontal therapy.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de tejido periodontal

El periodonto es el tejido de soporte de los dientes y está conformado por cuatro tejidos: encía, cemento radicular, hueso alveolar y ligamento periodontal (**Fig. 1**)¹.

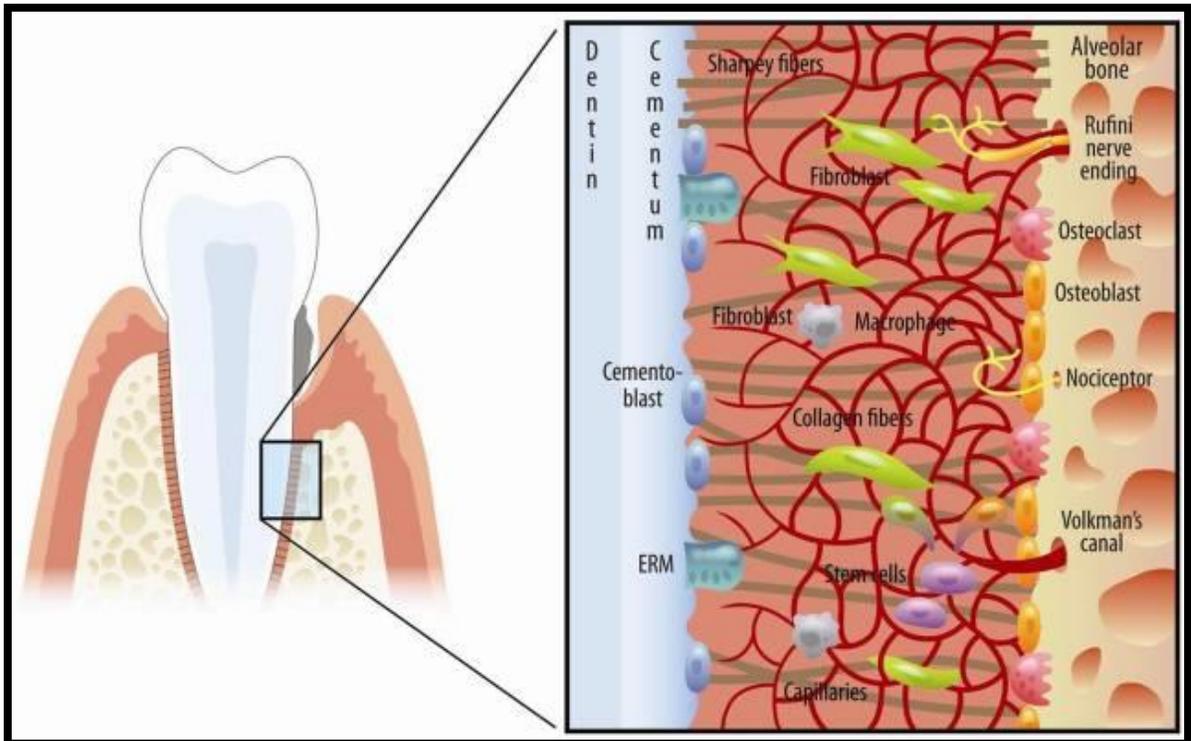


Figura 1. Esquema del tejido periodontal. Encía, cemento, ligamento periodontal, hueso alveolar. Osteoblastos (naranja), osteoclastos (rosa) en la proximidad del hueso; fibroblastos (verde) con fibras de colágena orientadas (gris); células troncales mesenquimales (morado); cementoblastos (azul), células epiteliales de los restos de Malassez (ERM), vasos sanguíneos (rojo).

La encía es una membrana mucosa que cubre el reborde alveolar y rodea el cuello de los dientes a los cuales se adhiere a través de la unión dentogingival o epitelio de unión el cual mantiene aislados los tejidos que forman parte del periodonto aislados del ambiente bucal. Se trata de un tejido epitelial escamoso estratificado queratinizado con tejido conectivo denso subyacente. En el tejido

conectivo se encuentran células inflamatorias como leucocitos polimorfonucleares y linfocitos T las cuales migran a través del epitelio de unión hacia el saco gingival y eventualmente al fluido oral.²

El cemento es un tejido conectivo avascular, mineralizado que se encuentra cubriendo las raíces de los órganos dentarios, el cual tiene como función principal unir las fibras del ligamento periodontal. Se distinguen dos tipos de cemento de acuerdo a la presencia o no de células: el cemento acelular y el cemento celular. El cemento acelular se encuentra en el tercio cervical y tercio medio de la raíz, y tiene un espesor alrededor de 10 µm en la zona cervical. En el cemento acelular se insertan fibras de colágena producidas por los fibroblastos del ligamento periodontal, las cuales se denominan fibras de Sharpey, que cumplen la función de unir al diente. Por otro lado, el cemento celular se encuentra en el tercio apical de las raíces y en las furcas de dientes multirradiculares y su espesor puede llegar arriba de los 100 µm, sobre todo en el ápice radicular. Este cemento toma su nombre debido a la presencia de cementoblastos que quedan incluidos en la matriz que ellos mismos producen, transformándose en cementocitos. La composición del cemento es de 50% de matriz inorgánica compuesta por hidroxiapatita y, 50% de matriz orgánica constituida por colágena tipo I principalmente, otros tipos como colágena tipo III, XII, y en menor proporción tipo V, VI y XIV. La matriz orgánica también incluye otras proteínas no colágenas que se encuentran en el hueso.^{2, 3}

El hueso alveolar forma los procesos alveolares que se encuentran en la mandíbula y maxilar. Los procesos alveolares rodean los alveolos dentarios, los cuales son cavidades cónicas que alojan los órganos dentarios. El hueso alveolar es un tejido conectivo mineralizado constituido por un 60% de matriz inorgánica, principalmente cristales de hidroxiapatita y, 40% de matriz orgánica y agua. Los osteoblastos son las células encargadas de síntesis, secreción y mineralización de la matriz orgánica, la cual está compuesta de proteínas, la más abundante es la colágena tipo I en un 90% y el 10% restante son proteínas no colagénicas como glicoproteínas, fosfoproteínas y proteoglicanos. A medida que los osteoblastos van secretando la sustancia osteoide que se calcifica, algunos quedan encerrados

dentro de la misma matriz y se transforman en osteocitos. La función que cumple el hueso alveolar es dar soporte al diente ya que une las fibras de colágena del ligamento periodontal, además de responder a las fuerzas de masticación con un proceso de remodelación ósea constante.¹⁻³

El ligamento periodontal es un tejido conectivo especializado que se encuentra entre el cemento radicular y el hueso alveolar. Tiene un espesor entre 0.15 a 0.38 mm. Las principales células del ligamento periodontal son los fibroblastos, otras células que se encuentran son restos epiteliales de Malassez, monocitos, macrófagos, células endoteliales y células troncales progenitoras, las cuales tienen la capacidad de diferenciarse en fibroblastos de ligamento periodontal, cementoblastos y osteoblastos para la reparación o regeneración de los tejidos.^{2, 4} Como todos los tejidos, el ligamento periodontal tiene una matriz extracelular, la cual está compuesta por fibras colágenas y no colágenas. La colágena tipo I y colágena tipo III son las más abundantes en la matriz del ligamento periodontal, seguidas de colágena tipo V, VI, XII y XIV. Su principal función es mantener los órganos dentarios en su posición, resistir las fuerzas de masticación, ser propioceptivo para el control neuromuscular en la masticación y un reservorio celular para mantener la homeostasis y regenerar los tejidos dañados.^{1, 3}

El tejido periodontal es un tejido sometido a fuerzas de masticación, estas fuerzas ayudan a regular la formación y resorción ósea, así como la organización de las fibras del ligamento periodontal, ayudando a mantener los dientes en su posición.⁵ El funcionamiento adecuado del periodonto depende de la integridad estructural e interacción de los tejidos que lo conforman.

1.2 Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal puede clasificarse de manera general de acuerdo al sistema de clasificación para enfermedades periodontales propuesta en 1999 de la siguiente manera⁶:

1. Enfermedades gingivales
2. Periodontitis crónica
3. Periodontitis agresiva
4. Periodontitis asociada a enfermedades sistémicas
5. Enfermedad periodontal necrotizante
6. Abscesos del periodonto
7. Periodontitis asociada con lesiones endodóncicas
8. Deformidades de desarrollo o adquiridas

Las enfermedades periodontales más comunes son gingivitis y periodontitis. La gingivitis es una enfermedad periodontal no destructiva que consiste en la inflamación reversible de la encía por acumulación de placa dentobacteriana adherida a las superficies de los órganos dentarios, principalmente compuesta por microorganismos Gram-positivos. Clínicamente se caracteriza por enrojecimiento, sangrado y un aumento de volumen de la encía.^{7, 8}

Cuando la gingivitis no es tratada adecuadamente, y el proceso inflamatorio persiste, la enfermedad progresa a periodontitis. Esta enfermedad es multifactorial, es decir que puede ser causada por diversos factores ya sea genéticos, sistémicos y ambientales, así como la acumulación de microorganismos, principalmente Gram-negativos anaerobios facultativos, los cuales estimulan la respuesta inmune del hospedero dando como resultado una disrupción de los tejidos que conforman el periodonto, causando pérdida del tejido conjuntivo de unión, resorción ósea y formación de una bolsa periodontal por migración apical del epitelio de unión.⁷

La bolsa periodontal provee un ambiente ideal para el crecimiento y proliferación de las bacterias las cuales causan la destrucción de las fibras de

colágena, llevando a la destrucción progresiva del ligamento periodontal y hueso alveolar.²

La cavidad bucal presenta una microbiota compuesta de diversas comunidades de microorganismos que colonizan las superficies dentales y tejidos blandos. Estudios realizados para identificar placa dentobacteriana subgingival en sujetos sanos y en pacientes con enfermedad periodontal mostraron la presencia de diferentes especies bacterianas que se agrupan en cinco complejos (**Fig. 2**).⁹

Las bacterias de cada complejo se encuentran asociadas entre sí, formando la placa dentobacteriana. Este proceso comienza con la colonización de microorganismos los cuales se adhieren a la superficie dental; que pertenecen a los complejos de los conjuntos amarillo y morado, y que tienen receptores específicos para bacterias que se coagregarán denominadas colonizadores puente o secundarios. Estos colonizadores secundarios pertenecen a los complejos de los conjuntos naranja y verde, y tienen la capacidad de unirse a colonizadores primarios y tardíos. El tercer grupo de microorganismos está conformado por el complejo del conjunto rojo, formándose así la placa dentobacteriana (**Fig. 2**)

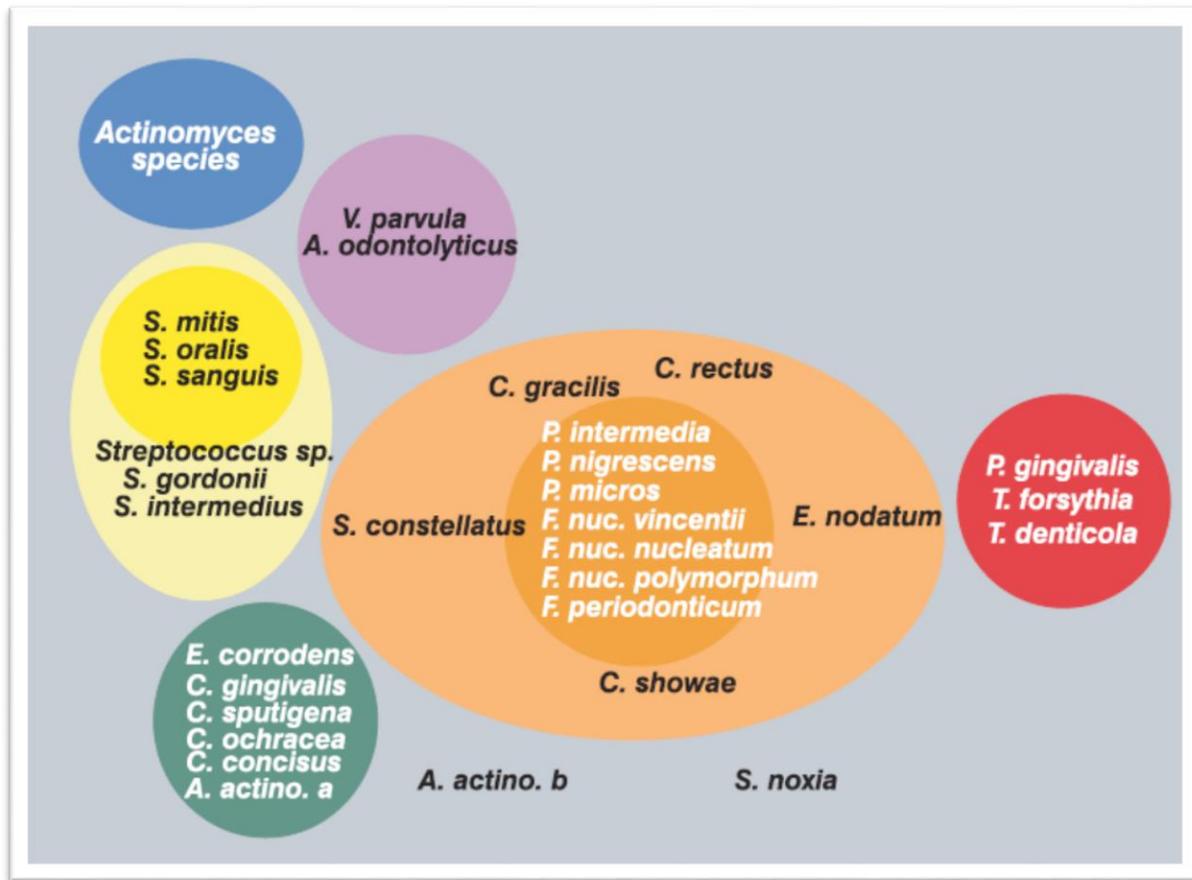


Figura 2. Conjuntos bacterianos de la placa subgingival.⁹

La presencia de ésta población heterogénea de bacterias que conforman la placa subgingival resulta en una respuesta inmunológica del hospedador exacerbada llevando a la destrucción del tejido periodontal. Las etapas iniciales de la periodontitis involucran la colonización bacteriana en la superficie del diente seguido de la respuesta inmunológica del huésped que consta de la inflamación activa y progresiva.¹⁰

El resultado de la presencia de periodontitis en pacientes susceptibles induce una respuesta innata, como es el proceso inflamatorio, en el que participan citocinas pro-inflamatorias, mientras que, en la respuesta adaptativa participan anticuerpos, entre otros. Las citocinas pro-inflamatorias favorecen que las células endoteliales y

fibroblastos produzcan metaloproteasas de matriz, prostaglandinas, entre otras citocinas llevando a la destrucción del tejido conectivo y hueso alveolar.⁵

En la periodontitis se ha observado que la resolución de la inflamación está asociada con altas concentraciones de ciclooxigenasas y mediadores lipídicos proinflamatorios como lipotoxinas, resolvinas y protectinas secretadas por los neutrófilos. Estas citocinas atraen a monocitos que se encargaran de la fagocitosis de bacterias y células apoptóticas, así como estimular la síntesis de péptidos antimicrobianos.⁵

1.3 Terapia periodontal

Los tratamientos empleados en odontología para la enfermedad periodontal pueden ser quirúrgicos y no quirúrgicos, cuyo objetivo es la eliminación de la placa dentobacteriana así como la regeneración de los tejidos a su forma original, arquitectura y restaurar su función.

El daño asociado a la gingivitis es reversible y puede ser tratado eliminando los agentes causales, además el tejido gingival tiene un gran capacidad de regeneración a su forma original y por tanto de recuperar su función después de un proceso inflamatorio.¹¹

Por otro lado, en una enfermedad destructiva como lo es la periodontitis existe inflamación, pérdida de los tejidos de soporte del diente, es decir se ven afectados el cemento, hueso alveolar y ligamento periodontal, por lo que el proceso de regeneración es más complicado ya que esto requiere la regeneración del tejido conectivo gingival, formación de nuevo cemento y restauración del hueso alveolar, así como las fibras de tejido conectivo del ligamento periodontal las cuales son importantes para formar el tejido de unión.¹

Dentro de los tratamientos no quirúrgicos están el raspado y alisado radicular, con el cual se busca la eliminación mecánica de la placa subgingival y, algunas veces puede ser combinado con administración sistémica de antibióticos como adyuvante. Sin embargo, en muchos casos este tratamiento no es suficiente

haciendo necesario repetir el procedimiento, además una de las desventajas es el difícil acceso a las superficies radiculares debido a la anatomía propia de los órganos dentarios que no permiten que se elimine por completo el factor etiológico, por lo que se cree que las bacterias residuales o que no son removidas por el tratamiento que se encuentran en la superficie radicular y tejidos blandos pueden favorecer la nueva formación de placa dentobacteriana.³

Existen tratamientos quirúrgicos dentro de los cuales se encuentran la cirugía de debridación por colgajo, injertos óseos, acondicionamiento de la superficie radicular, regeneración tisular guiada o combinación de éstos, sin embargo los resultados clínicos aún no son óptimos.

El debridamiento por colgajo es un procedimiento estándar para el tratamiento de periodontitis, cuyo objetivo es proporcionar acceso y poder visualizar los tejidos dañados, para realizar una eliminación mecánica de la placa subgingival y descontaminar la superficie radicular con una visión directa. Con este procedimiento se puede modelar la forma y arquitectura requerida por una osteoplastia. La finalidad de este tratamiento es detener la enfermedad y crear las condiciones necesarias que favorezcan el crecimiento del nuevo tejido.¹²

Con la finalidad de crear un ambiente adecuado para la regeneración se ha considerado que las superficies radiculares deben ser acondicionadas de tal manera que puedan conducir la adhesión celular y la posterior síntesis de matriz. Por tanto, la raíz debe descontaminarse no solo mecánicamente, ya que después de este procedimiento puede quedar una capa de material orgánico e inorgánico que puede inhibir la unión de las células y por tanto la formación de nuevo tejido conectivo que se adhiera a la superficie radicular. Es por esto que se han estudiado diversos agentes, los cuales se ha visto pueden modificar la superficie radicular, entre los cuales se encuentran: ácido cítrico, tetraciclina hidrocliclorida, doxiciclina hidrocliclorida, ácido fosfórico, hipoclorito de sodio, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), y recubrimientos con agentes biológicos como fibronectina, laminina, entre otros. Estos agentes no solo eliminan la capa de material residual de la superficie, sino que también agrandan los túbulos de la dentina los cuales puede entrar en

tejido conectivo durante la regeneración y, los agentes biológicos pueden favorecer la unión de otras proteínas para favorecer la regeneración.^{11, 13}

Los injertos óseos se han utilizado en combinación con cirugías de colgajo con la finalidad de favorecer la regeneración periodontal y dentro de las características ideales que deben cumplir estos materiales se encuentran que tienen que ser capaces de favorecer la osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción. Existen diferentes tipos de injertos óseos dependiendo de su origen, los cuales pueden ser autógenos, es decir que el injerto es tomado de alguna otra zona del mismo paciente; injerto alogénico, el cual proviene de un organismo de la misma especie; xenoinjerto, que proviene de otra especie y, materiales sintéticos llamados aloinjertos, los cuales son implantados en las zonas dañadas.¹⁴ Sin embargo, este tratamiento aún se ve limitado en cuanto a la regeneración del periodonto ya que no induce la formación de nuevo cemento y ligamento periodontal, aunque se puede observar ganancia en la altura del hueso de aproximadamente 3 mm.^{11, 15}

Sin embargo, independientemente del procedimiento utilizado, las células epiteliales son capaces de proliferar en la zona afectada más rápido que el resto de los tejidos de origen mesenquimal, lo cual resulta en la formación de un epitelio largo de unión que se fija a la superficie radicular del órgano dentario, lo cual clínicamente puede ser aceptable, pero no es un proceso de regeneración ya que no permite la migración selectiva, proliferación y diferenciación de las células derivadas del ligamento periodontal, las cuales tienen el potencial de formar nuevo tejido de inserción incluyendo hueso alveolar, cemento y fibras del ligamento periodontal.^{11,}

16

Teniendo en cuenta la necesidad separar las células epiteliales para favorecer la regeneración periodontal, en la década de 1980, fue propuesta la regeneración tisular guiada (RTG) en la cual se utilizan barreras físicas las cuales evitan la migración apical del epitelio gingival para facilitar la migración y proliferación de células derivadas del ligamento periodontal y su diferenciación para la formación de cemento, hueso alveolar y ligamento periodontal. existen diferentes

materiales los cuales pueden ser no reabsorbibles dentro de los cuales el politetrafluoretileno ha sido utilizado exitosamente, sin embargo, es necesaria una cirugía para remover la membrana, por tanto se ha extendido el uso de materiales reabsorbibles, principalmente polímeros sintéticos o naturales como son ácido poliláctico, ácido poliglicólico o su copolímero, el ácido poliláctico-co-glicólico, colágena.^{14, 16}

Los resultados obtenidos con la técnica de RTG son mejores en comparación con las cirugías de colgajo solas, ya que hay una menor recesión gingival y en su uso en conjunto con un injerto óseo se ha observado una mejora en la reparación ósea, sin embargo los resultados no son concluyentes ya que en estudios a largo plazo muestran gran variabilidad en estudios histológicos, donde un se puede apreciar la formación de un epitelio largo de unión por crecimiento de células epiteliales entre la membrana y la superficie del diente. Otro de los inconvenientes es el desarrollo de infecciones post-quirúrgicas debido a una falta de aislamiento de la zona dañada al ambiente bucal, por esta razón usualmente se prescriben antibióticos sistémicos para reducir la contaminación bacteriana y prevenir la infección de los tejidos.^{11, 15, 16}

1.4 Uso de la tetraciclina como adyuvante en la Terapia periodontal

Se ha demostrado que la contaminación bacteriana después de un tratamiento periodontal es un factor que afecta el proceso de regeneración de los tejidos periodontales, es por esto que una de las medidas a seguir para reducir los agentes irritantes y controlar la infección es la administración de antibióticos sistémicos o locales como coadyuvante al tratamiento periodontal. Entre los antibióticos más empleados se encuentran las penicilinas, tetraciclinas, metronidazol, clindamicina y azitromicina.¹⁷

La desventaja de la administración sistémica, es que los fármacos pasan por una etapa de biodegradación en el tracto gastrointestinal por el ambiente ácido. Después es absorbido por células epiteliales del intestino y distribuido a los tejidos por la circulación sistémica, hasta llegar al líquido crevicular, donde el flujo de salida

del líquido crevicular en la bolsa periodontal es de 20 $\mu\text{l/h}$ en un estado intermedio de periodontitis, es decir que es reemplazado alrededor de 40 veces por hora, por lo que aun cuando el antibiótico llegue en concentraciones adecuadas dentro de la bolsa periodontal, el constante recambio del líquido crevicular disminuye el tiempo en el que está en contacto el agente activo del antibiótico con la zona afectada.^{18, 19}

Las tetraciclinas son una familia de antibióticos, descubiertos en 1948 por Duggar como un producto de fermentación producido por la bacteria *Streptomyces aureofaciens*, cuya estructura básica de la tetraciclina consta de un sistema de anillos neftacenocarboamida tetracíclico (**Fig. 3**)²⁰. Es un antibiótico de amplio espectro, con acción bacteriostática en bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, aerobios y anaerobios, rickettsias, micoplasmas, clamidias, y algunos protozoos.^{13A} Las tetraciclinas han sido empleadas durante muchos años en el tratamiento de diversas enfermedades que afectan la cavidad bucal entre las cuales se encuentran gingivoestomatitis herpética aguda, estomatitis aftosa recurrente, adyuvante de la cirugía periodontal, como terapia inicial en la gingivitis ulcero-necrotizante aguda y en el tratamiento de abscesos periodontales.²¹

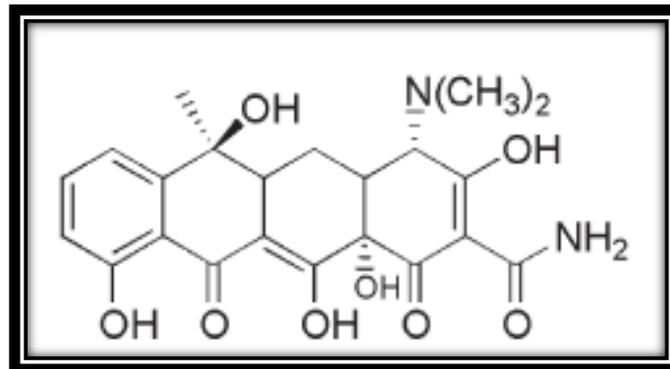


Figura 3. Estructura de la tetraciclina.

El mecanismo de acción de los fármacos de esta familia es entrar a las células bacterianas por difusión pasiva a través de poros hidrofílicos de la membrana externa y después atraviesan la membrana citoplasmática por transporte

dependiente de energía, una vez que se encuentra en el citoplasma, se une a la subunidad ribosomal 30S inhibiendo la unión del tRNA con el complejo ribosomal.²²

Las tetraciclinas se han utilizado ampliamente en la medicina ya que además de su acción antimicrobiana posee otras propiedades, las cuales han sido utilizadas como ventaja en el tratamiento de diversas enfermedades y en la terapia periodontal. Dentro de éstas propiedades no antibióticas se encuentra su efecto anti-inflamatorio ya que se ha estudiado la inhibición del movimiento de células inflamatorias, esto gracias a la propiedad quelante de las tetraciclinas, es decir que puede formar complejos con cationes metálicos los cuales puede transportar a través de barreras hidrofóbicas; por lo que al producirse una quelación con el calcio intracelular, el ensamblaje de los microtúbulos necesarios para el movimiento celular se ve inhibido. También ha sido estudiado su efecto en la inhibición de hidrolasas como la fosfolipasa A secretora, donde se han observado resultados positivos en el tratamiento de artritis reumatoide con minociclina, sin embargo aún es desconocido el modo de unión de las tetraciclinas a la fosfolipasa A secretora, sin embargo se ha propuesto que se forma un complejo que interfiere con la unión el sitio de unión del calcio en la enzima con lo cual inhibe su actividad y por tanto la liberación de ácido araquidónico y por tanto de la biosíntesis de eicosanoides que están involucrados en la patogénesis de la inflamación.²³⁻²⁵

También esta reportado que las tetraciclinas con capaces de inhibir la acción de metaloproteasas de matriz (MMP) las cuales son enzimas dependientes de zinc y que degradan la matriz extracelular (MEC), las cuales están involucradas tanto en procesos fisiológicos como la remodelación de MEC, embriogénesis y reparación de tejido postnatal; así como en procesos patológicos, como el caso de periodontitis, enfermedades autoinmunes de la piel y fotoenvejecimiento cutáneo, artritis reumatoide, osteoartritis, ulceraciones crónicas, involución uterina, cicatrización de heridas, resorción ósea, y progresión y metástasis de tumores. Se han propuesto diversos mecanismos de acción ya sea por la quelación del zinc en el dominio catalítico de las MMP resultando en cambio estructural de la proteína o por inhibición de la activación oxidativa e incremento en la degradación de MMP,

inducción de apoptosis, inhibición de la fosfolipasa A2 secretora, inhibición de la producción de TNF- α e IL-8 y reducción en la expresión de serina-proteasa y tripsinógeno-2.^{26, 27}

Las tetraciclinas son los antibióticos más frecuentemente utilizados en la terapia periodontal, ya que una de las ventajas es que alcanza niveles en el líquido crevicular de 1 a 8 $\mu\text{g/ml}$, así como poseer otras propiedades inherentes a su efecto antimicrobiano entre las cuales están su efecto anti-inflamatorio, evitar la resorción ósea, la inhibición de metaloproteasas de matriz.^{27, 28}

1.4 Bioingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario en el cual se integran los avances en las ciencias biológicas, médicas e ingenierías con los avances en la ciencia de los nanomateriales para el desarrollo de sustitutos biológicos que sean capaces de sustituir, reparar y mantener o mejorar la función de tejidos u órganos.²⁹

Para lograr la regeneración de tejidos se busca el diseño de andamios los cuales deben de cumplir con características que los hagan buenos candidatos para su uso en la ingeniería de tejidos, entre ellas destacan: mimetizar la matriz extracelular para guiar la adhesión y proliferación celular, y así poder desarrollar una estructura tridimensional; ser biocompatibles y no inducir respuestas adversas; ser biodegradables o bioabsorbibles es decir que una vez que las células son capaces de secretar su propia matriz extracelular el polímero se degrade para dar lugar a la formación del tejido; tener buenas propiedades mecánicas de acuerdo al tejido que se desee regenerar; ser altamente porosos para favorecer la vascularización y transporte de nutrientes y no interferir con procesos fisiológicos. En algunos casos se busca que tengan la capacidad de incorporar moléculas o fármacos, para distribuirlos y facilitar su liberación de manera homogénea en concentraciones adecuadas durante un tiempo prolongado en condiciones fisiológicas.^{30, 31}

El objetivo de estos andamios es proveer a las células un ambiente y arquitectura adecuados para que puedan interactuar con el material y así promover una respuesta, es por esto que se busca imitar la matriz extracelular con andamios en rangos nanométricos ya que las fibras que forman parte de la matriz están en los rangos de 50-500 nm, por lo que las células pueden interactuar con más de una fibra de la matriz extracelular proporcionándole así orientación y estructura a los tejidos. Por tanto los andamios nanoestructurados son ideales para la regeneración de tejidos.³¹

Con el objetivo de lograr imitar la matriz extracelular se ha buscado en el campo de la nanotecnología técnicas que puedan ser aplicadas para la ingeniería de tejidos y conseguir fabricar andamios con fibras en rangos nanométricos y con topografía adecuada para guiar la respuesta celular. Dentro de las técnicas empleadas y que mejores resultados han dado están el autoensamblaje, separación de fases y electrospinning.³²

El autoensamblaje se basa en las interacciones no covalentes de las moléculas ya sea moléculas orgánicas, proteínas, péptidos o DNA, entre otros, y se ha utilizado para la fabricación de materiales biológicos tridimensionales que pueden ser aplicados en la ingeniería molecular.³³⁻³⁵ La separación de fases consiste en la separación termodinámica de una solución polimérica, la cual al ser sometida a una temperatura baja se obtiene una fase con baja concentración de polímero y otra con alta concentración del polímero, y posteriormente se hace la extracción del solvente por evaporación o sublimación dejando poros dentro de la matriz polimérica.^{36, 37} Sin embargo estas técnicas consumen mucho tiempo y no se pueden hacer fibras de manera continua, lo cual hace al electrospinning una técnica ideal para la producción en masa de fibras, aparte de ser versátil, simple y accesible para la producción de estas.

1.4.1 Técnica de Electrospinning

El electrospinning es una técnica patentada en 1934 por Formhals quien describió el proceso y el equipo para la producción de fibras a partir de una solución. Más tarde en 1969, Taylor describe el comportamiento del polímero en la punta del capilar de la jeringa, a partir de la cual se eyecta el polímero por la generación del campo eléctrico, con lo cual se explica mejor porque las fibras son de diámetros más pequeños incluso que la misma punta. Es entonces cuando la técnica de electrospinning comenzó a ser utilizada en el campo de la nanotecnología, para la producción de fibras para diferentes aplicaciones.³⁸

El equipo de electrospinning consta de una jeringa en la cual estará la solución polimérica cuya punta tiene un tamaño determinado, una fuente de alimentación de alto voltaje que va de los 5 a 60 kV, y una superficie metálica plana o un mandril metálico que funciona como colector, el cual generalmente es de aluminio, o puede ser algún otro material conductor del cual sea fácil retirar las fibras recolectadas.³⁹ (Fig. 4)

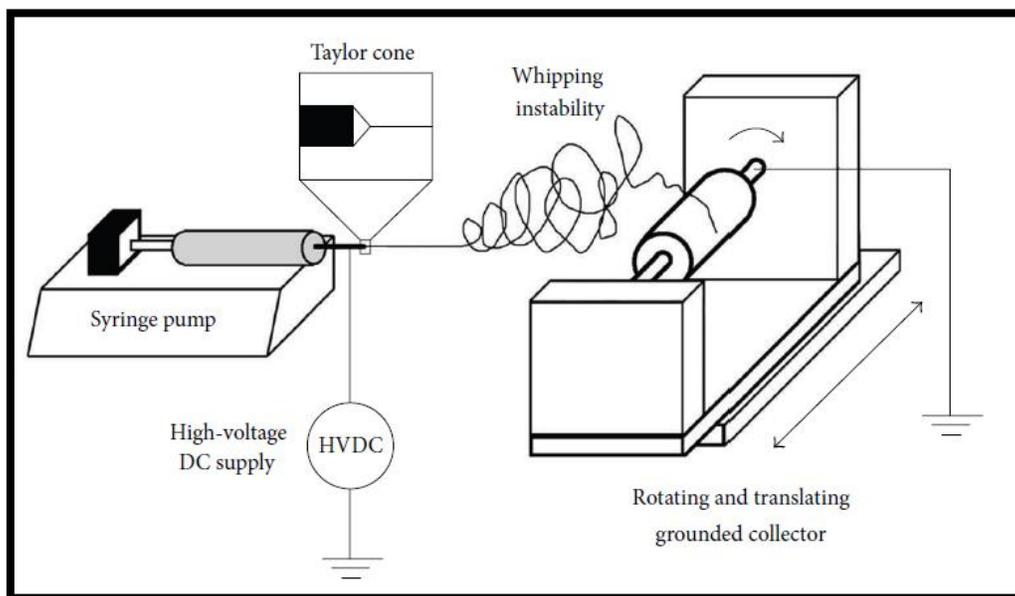


Figura 4. Esquema del equipo de electrospinning.³⁹

El proceso de electrospinning consiste en la aplicación de alto voltaje a una solución polimérica a través de un capilar o punta metálica para producir fibras.

Cuando la carga es mayor que la tensión superficial del polímero se produce un “hilo” o fibra la cual es dirigida al colector que puede estar a una distancia entre 10 y 20 cm de la punta y que es el polo opuesto o puede estar conectado a tierra. Cuando se comienza a aplicar voltaje se genera un campo eléctrico, la solución polimérica al final del capilar forma un cono, debido a que las fuerzas electrostáticas superan la tensión superficial de la solución. Este fenómeno se conoce como cono de Taylor. En el trayecto de la punta al colector, el disolvente se evapora y las fibras se solidifican al llegar al colector.^{40, 41}

Existen parámetros que pueden ser modificados y que influyen en la morfología y diámetro de las fibras, los cuales podemos clasificar en tres grupos (**Tabla 1**): los que dependen de las propiedades de la solución polimérica; las condiciones del proceso; y las condiciones ambientales.^{42,}

Tabla 1. Parámetros del electrospinning que influyen en la morfología de las fibras.

Propiedades de la solución
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Viscosidad</i> • <i>Conductividad</i> • <i>Peso molecular</i> • <i>Tensión superficial</i>
Condiciones del proceso
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Campo eléctrico aplicado</i> • <i>Distancia entre punta y colector</i> • <i>Velocidad de flujo</i>
Condiciones ambientales
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Humedad</i> • <i>Temperatura</i>

a) Parámetros de la solución

La viscosidad así como la tensión superficial dependen de la estructura y concentración del polímero en la solución. La viscosidad tiene que ver con el nivel de entrecruzamiento del polímero es decir, si el polímero presenta entrecruzamientos, la solución será de alta viscosidad y el diámetro de las fibras podría ser mayor, por otro lado, si no presenta entrecruzamientos o son muy pocos, la viscosidad será baja dando como resultado fibras con diámetros menores. Por otro lado la viscosidad se puede ver aumentada en una solución concentrada y esto dificultar la salida de la solución a través de la punta, por otro lado si el polímero está muy diluido, se pueden formar gotas.³⁹

En cuanto a la conductividad, se sabe que una solución debe tener una alta conductividad para poder transportar cargas, lo cual favorece el estiramiento de la solución y la formación de fibras más delgadas. Es por esto que los polímeros se han utilizado ampliamente con esta técnica ya que son dieléctricos, y al ser sometidos a un campo eléctrico externo se puede estirar la solución. Para aumentar ésta propiedad, se puede elegir entre diversos disolventes, los cuales tienen altas constantes dieléctricas, con lo cual se formarían fibras, de menores diámetros y uniformes.^{39, 41}

La elección del solvente adecuado es importante ya que de esto depende la morfología y tamaño de las fibras, e influye en la viscosidad, tensión superficial y conductividad de la solución polimérica. Dentro de los solventes utilizados están el cloroformo, acetona, etanol, dimetilformamida, ácido trifluoroacético, tetracloruro de carbono, diclorometano y agua, los cuales deben tener ciertas propiedades como buena volatilidad, constante dieléctrica, y mantener la integridad del polímero.⁴¹

b) Parámetros del proceso

El voltaje es uno de los parámetros más importantes a tomar en cuenta en ésta técnica ya que la producción de fibras es debida a la aplicación de éste, el cual rompe la tensión superficial del polímero. Aunque aún hay controversia sobre su

influencia en el diámetro de las fibras, ya que algunos autores reportan que cuando se aplican altos voltajes, hay un mayor flujo de polímero y por tanto se obtienen fibras con diámetros mayores; mientras que otros reportan que ese voltaje puede producir gotas en las fibras. Sin embargo, en la mayoría de los casos, un alto voltaje favorece el estiramiento de la solución y una rápida evaporación del solvente. Por lo tanto, se debe tener en cuenta el comportamiento de la solución a diferentes voltajes ya que depende de las propiedades viscoelásticas del polímero.^{40, 41}

Por otro lado la velocidad de salida de la solución influye en la evaporación del solvente, en el diámetro de las fibras, y en la porosidad final, siendo mejor un flujo de salida lento para que el solvente pueda evaporarse y evitar la formación de defectos en las fibras.³⁹

Otro parámetro que podría modificar tanto la morfología como el diámetro de las fibras es la distancia de la punta eyectora al colector, ya que debe haber una distancia suficiente para que se evapore el solvente pero no debe excederse ya que podría romperse la fibra o formar gotas.⁴¹

c) Parámetros ambientales

La humedad y temperatura son factores ambientales que deben tomarse en cuenta, ya que afectan la morfología de las fibras. Por ejemplo, la temperatura puede influir en la viscosidad de manera inversa, es decir, que un aumento en la temperatura causa la disminución de la viscosidad por tanto se obtiene fibras de menor diámetro. En cuanto a la humedad, un aumento de ella puede obtenerse fibras de diámetros menores. También se ha observado que la humedad puede formar poros en la superficie de las fibras, lo cual puede beneficiar la migración celular; por otro lado, en un ambiente menos húmedo el solvente se evapora más rápido, sin embargo esto puede representar un problema ya que la punta de donde es expulsado el polímero podría obstruirse.^{39, 41}

1.4.2 Técnica de Electrospray

Las nanopartículas, por definición son partículas que están en un rango de 100-1000 nm y han sido utilizadas en diversos campos como en diagnóstico médico, terapia fototérmica, liberación de ácidos nucleicos, bioingeniería de tejidos y en sistemas de liberación de fármacos.⁴³ Se han desarrollado diferentes técnicas para la fabricación de micro y nanopartículas como emulsificación de solvente, evaporación de solvente, coacervación/precipitación, gelación iónica entre otras; sin embargo estas técnicas necesitan de agentes entrecruzantes, los cuales después son difíciles de eliminar, lo que representa un mayor riesgo de toxicidad del material. Otra opción de bajo costo y donde no se utilizan agentes entrecruzantes es el uso de la técnica de electrospray.^{44, 45}

El electrospray es una técnica de atomización de líquidos, empleada para diseñar sistemas de liberación controlada de fármacos a partir de partículas poliméricas biodegradables. En general, el electrospraying es similar al electrospinning, pero una de las diferencias fundamentales es en la concentración del polímero, ya que mientras en el electrospinning se requieren de concentraciones altas del polímero para formar fibras, en el electrospray la concentración del polímero es relativamente menor para generar micro o nanopartículas.^{46, 47}

Las fuerzas electrostáticas generadas por el voltaje superan la tensión superficial de la gota formada en la punta del capilar de la jeringa, que al igual que en el electrospinning cambia de forma, formando el cono de Taylor. Debido a un exceso de carga eléctrica en el cono; este necesita ser disipado, y con ello se logra que sean eyectadas gotas en micro y nano escala a partir del cono de Taylor, reduciendo la carga y no la masa. Esto se puede explicar por la repulsión de cargas, lo cual genera gotas bien dispersadas evitando que se unan en el trayecto hacia el colector.⁴⁶

Al igual que en el electrospinning pueden modificarse diversos parámetros dando como resultado partículas de menor diámetro por aumento de tensión superficial y conductividad; y por otro lado partículas de diámetro mayor por un

aumento en la velocidad de flujo y viscosidad de la solución. Las ventajas de sintetizar nanopartículas para la liberación de moléculas o fármacos es que las moléculas no sufren desnaturalización, la eficiencia de encapsulación de moléculas es alta y la distribución de las partículas es de manera homogénea.^{46, 47}

La ingeniería de tejidos y la liberación de fármacos están ampliamente relacionados y se ha buscado en el campo de las nanociencias el desarrollo de sistemas que puedan integrar ambos campos. Recientemente se ha propuesto el uso simultáneo de la técnica de electrospinning y electrospraying, que consiste en la formación de nanofibras y nanopartículas con el uso paralelo de una fuente de poder y jeringas para el diseño de andamios híbridos, los cuales sean capaces de guiar la respuesta celular, así como liberar moléculas, ya sea proteínas, factores de crecimiento o antibióticos, para favorecer la regeneración de los tejidos.

1.4.3 Materiales poliméricos utilizados en la bioingeniería de tejidos y liberación de fármacos

Los materiales empleados para la fabricación de andamios fibrilares y nanopartículas para la liberación de fármacos son los polímeros, los cuales pueden ser de origen natural, sintéticos o una mezcla de ellos. Dentro de los polímeros naturales utilizados en ingeniería de tejidos están fibrina⁴⁸, colágena^{49, 50}, gelatina⁵¹⁻⁵³, quitina⁵⁴, quitosano^{52, 55} y alginato⁵⁶. Los polímeros sintéticos como poli (ácido láctico) (PLA)^{57, 58}, poli (ácido glicólico) (PGA)⁵⁰ y su copolímero poli (láctico-co-glicólico) (PLGA)^{53, 59}, poli (ϵ -caprolactona) (PCL)^{52, 60, 61}, entre otros son muy utilizados en la ingeniería de tejidos.

La poli (ϵ -caprolactona) (PCL) es un poliéster alifático (**Fig. 5**), que se obtiene mediante la polimerización por apertura de anillo (ROP, por sus siglas en inglés) de la ϵ -caprolactona, con el uso de octoato de estaño como catalizador.⁶²

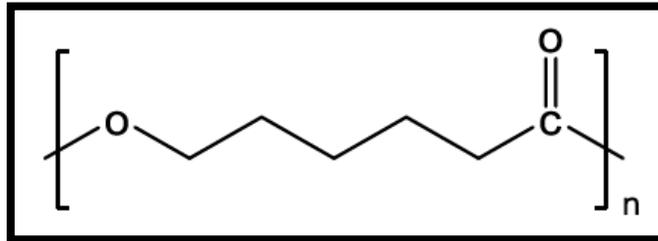


Figura 5. Estructura de la poli (ϵ -caprolactona)⁶²

El PCL es un poliéster semicristalino, que depende del peso molecular que puede variar entre 3,000 a 80,000g/mol. Tiene una temperatura de fusión bajo alrededor de 55-60°C y una temperatura de transición vítrea de -60°C, dependiente de su cristalinidad.⁶²

El PCL es aprobado por la Food and Drug Administration (FDA), y ha sido ampliamente utilizado en el área biomédica como en suturas, recubrimientos de heridas y dispositivos de fijación, dispositivos anticonceptivos, así como material de relleno en odontología.

En el campo de la bioingeniería de tejidos se ha utilizado el PCL para el diseño de andamios para la regeneración de tejidos como hueso, cartílago, tendones, sistema cardiovascular, piel y nervios. También se ha buscado su uso en sistemas de liberación de fármacos a partir de diferentes técnicas dando como resultado estructuras como nanoesferas, nanofibras, esponjas, entre otros. El uso del PCL se ha extendido, ya que presenta ventajas sobre otros polímeros por sus propiedades físicas y mecánicas, ya que resiste fuerzas de tracción entre 12 y 30 MPa, además de ser estable en condiciones ambientales, de bajo costo, fácil de obtener y poder combinarse con otros polímeros ya sea sintéticos o naturales.^{48, 63-}

El PCL en condiciones fisiológicas es degradado por hidrólisis de los enlaces éster. El proceso de degradación se divide en dos fases: la primera consiste en la hidrólisis no enzimática de los grupos éster, causando una disminución en el peso molecular y por tanto aumentando su cristalinidad, después en la segunda etapa el polímero es degradado por las células. En estudios se ha encontrado que los fragmentos de PCL, una vez que su peso molecular disminuye, se encuentran en fagosomas de macrófagos y en células gigantes y se encontraron también dentro de fibroblastos. La presencia de enzimas como proteasas, amilasas y lipasa pancreática acelera la degradación del polímero.⁶⁸⁻⁷⁰

Debido a su lenta velocidad de degradación en comparación con otros poliésteres como el poli (ácido láctico), poli (ácido glicólico) y sus copolímeros, se ha utilizado como dispositivos a largo plazo para procesos regeneración de tejidos que requieren de más tiempo.

Dentro de los polímeros naturales, se ha estudiado el quitosano, que es un polímero natural semicristalino que se obtiene a partir de la desacetilación alcalina de la quitina que se encuentra en crustáceos, insectos y la pared de los hongos. Comercialmente, tienen un peso molecular entre 3800 y 20000 Da, con un grado de desacetilación que va de 66% a 95%. Es un polisacárido similar a la estructura de la celulosa, está constituido por enlaces β -1,4 de D- glucosamina y N-acetilglucosamina (**Fig. 6**).^{71, 72}

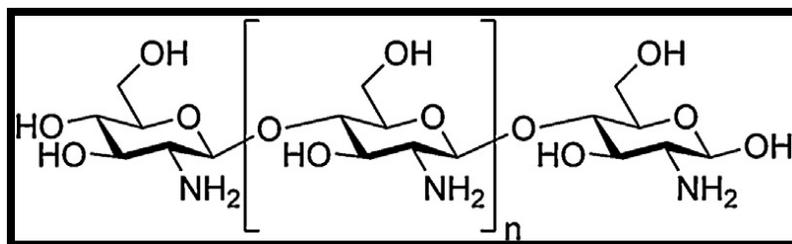


Figura 6. Estructura del quitosano

Los grupos amino en su estructura le dan propiedades especiales para su uso en aplicaciones farmacéuticas, tiene carga positiva y es mucoadhesivo, por lo que es ampliamente utilizado para la liberación de fármacos. El quitosano es un polisacárido catiónico, cuya solubilidad depende de la distribución de grupos amino y N-acetil libres; en pH neutro o básico, presenta grupos amino libres, siendo insoluble en agua. En pH ácido los grupos aminos pueden protonarse y ser entonces soluble en agua. Para poder disolver el quitosano generalmente se utilizan soluciones entre 1% a 3% de ácido acético.^{73, 74}

El quitosano es biocompatible ya que no causa reacciones inmunológicas, *in vivo* se degrada enzimáticamente por acción de la lisozima y sus productos de degradación no son tóxicos para el organismo ya que son aminoazúcares.⁶⁴ Se ha propuesto su uso como biomaterial en la regeneración de tejidos y liberación de fármacos en diversas formas como membranas, esponjas, fibras, microesferas, hidrogeles y nanopartículas. En el caso de las nanopartículas, se han fabricado por diferentes métodos como entrecruzamiento por emulsificación, coacervación-precipitación, secado por aspersion, gelación iónica, y electrospray.³² Dentro de las ventajas que ofrece el quitosano en forma de nanopartículas son que puede controlar la liberación de la sustancia activa, por su naturaleza catiónica puede entrecruzarse con aniones multivalentes, y su propiedad mucoadhesiva incrementa el tiempo residual en el sitio de acción.⁴⁵

Recientes investigaciones se han centrado en el uso de sistemas de liberación local de fármacos para su aplicación en la terapia periodontal, con lo cual se busca la ventaja de ofrecer un mayor tiempo de retención de la sustancia activa en la bolsa periodontal; esto con la finalidad de controlar el ambiente subgingival, y en particular se ha buscado en el campo de la bioingeniería de tejidos en conjunto con el uso de las nuevas técnicas del campo de las nanociencias el diseño de dispositivos para la administración de agentes antimicrobianos, para reducir la profundidad de la bolsa.^{75, 76}

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La pérdida de los tejidos periodontales debida a la progresión de la enfermedad periodontal como lo es la periodontitis, pueden llevar a la pérdida de los órganos dentarios, por lo que se ha buscado diferentes métodos dentro de la terapia periodontal que faciliten la regeneración de los tejidos, restaurando la morfología, fisiología, estética y confort de los tejidos afectados.

Se han utilizado barreras, las cuales son colocadas en las zonas dañadas por medio de cirugía para guiar la regeneración del tejido. Sin embargo es difícil regenerar el tejido periodontal ya que es un tejido compuesto, además de que los procedimientos de implantación de estas barreras pueden estar asociados a infecciones e inflamación, con lo cual se puede ver afectado el proceso de regeneración, por lo que se hace necesario la investigación de nuevas estrategias para el desarrollo de andamios híbridos que permitan guiar la respuesta celular, así como liberar agentes antimicrobianos en las zonas afectadas por la enfermedad periodontal.

Los avances en el campo de la bioingeniería de tejidos y las nanociencias han permitido el desarrollo de andamios que sustituyan la matriz extracelular de los tejidos, logrando características topográficas y estructurales que permitan la adhesión, migración y proliferación celular necesarios para la regeneración tisular, así como la liberación controlada de antibióticos y/o factores que regulen la regeneración.

Es por esto que proponemos los andamios electrohilados en rangos nanométricos que puedan conservar la integridad estructural y mecánica el tiempo necesario para permitir la regeneración; e integrados a estos andamios, nanopartículas que contengan un agente antimicrobiano como lo es la tetraciclina, para su liberación controlada en la bolsa periodontal, favoreciendo la regeneración del tejido periodontal más eficazmente.

3. HIPÓTESIS

Los andamios co-electrohilados de PCL/quitosano con clorhidrato de tetraciclina tienen actividad antimicrobiana, soportan y guían la respuesta celular, son una alternativa potencial en la Terapia Periodontal.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Caracterizar la respuesta biológica de los andamios co-electrohilados de PCL/quitosano con diferentes concentraciones de clorhidrato de tetraciclina.

4.2 Objetivos específicos

- a) Establecer el efecto de las membranas co-electrohiladas de PCL/quitosano con clorhidrato de tetraciclina en la adhesión y proliferación de fibroblastos derivados de ligamento periodontal.

- b) Determinar las propiedades antimicrobianas de las membranas co-electrohiladas de PCL/quitosano con clorhidrato de tetraciclina en cultivos bacterianos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño de los andamios de PCL con nanopartículas de quitosano con tetraciclina.

Para el diseño de los andamios con antibiótico se utilizó la técnica de co-electrospinning como sigue. Se disolvieron gránulos de PCL en diclorometano/metanol (1:1 v/v) para formar una solución clara y homogénea al 10% (p/v). Una solución de clorhidrato de tetraciclina (TCH) cargada a una solución de quitosano (2%p/v) se utilizó para las nanopartículas mediante el uso de una concentración de TCH de 1, 3 y 5% (p/p) con respecto a la fracción de polímero utilizada para las nanopartículas. A través del uso simultáneo de electrospinning y electrospaying se obtuvieron los sistemas integrados, utilizando dos boquillas separadas en una hilera mediante el uso del sistema de electrospinning NANON 01 (MECC, Japón). Se utilizaron dos velocidades de flujo diferentes: 0.1 ml/h para la solución de quitosano cargado con TCH y 0.5 ml/h para la solución de PCL. Por otra parte se utilizó un voltaje de 16 kV a ambas puntas las cuales fueron colocadas a 10 cm de distancia del colector. Para mejorar la homogeneidad de las fibras y las partículas, la tobera de hilatura que contenía ambas boquillas fue movida en traslación (5 mm/s) a lo largo de 100 mm de ancho. Todas las muestras se secaron durante la noche bajo una campana de humos antes de ser utilizadas para su caracterización biológica y esterilizadas con radiación UV durante 20 minutos.

5.2 Ensayos biológicos.

5.2.1 Cultivo celular

Para realizar los ensayos biológicos se utilizaron fibroblastos derivados del ligamento periodontal (PDL) obtenidos por la técnica de explantes a partir de premolares sanos extraídos por razones ortodóncicas. Una vez extraídos los dientes, las células se aíslan haciendo un raspado del tercio medio de la raíz al tercio apical; el tejido se colocó en platos de cultivo de 6 pozos, y se mantuvo con medio de cultivo DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Gibco), suplementado

con 10% de suero fetal bovino (SFB), y una solución de antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad. Una vez que los fibroblastos del ligamento periodontal migraron fuera del tejido, y llegaron a confluencia de 80%, las células se despegaron con tripsina del plato de cultivo y se pasaron a platos de cultivo de 75 cm³, con las condiciones mencionadas anteriormente. El medio de cultivo se cambió dos veces a la semana. Para los ensayos biológicos se utilizaron fibroblastos del tercer pasaje.

5.2.2 Ensayo de adhesión celular

Para establecer el efecto de los andamios de PCL/quitosano con clorhidrato de tetraciclina en las concentraciones de 1%, 3% y 5% sobre la adhesión celular, se utilizó el ensayo de azul de triazol (MTT). Se cultivaron los fibroblastos del ligamento periodontal sobre los andamios co-electrohilados, a una densidad de 1x10⁴ células/mL por triplicado en cajas de cultivo de 48 pozos, durante 12 y 24 horas con medio de cultivo DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), y una solución de antibióticos (100U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂, en un ambiente con 100% de humedad. Después de cada tiempo, las células fueron incubadas con MTT (5mg/ml) a 37°C por 4 horas, pasado este tiempo, se retiró el sobrenadante y se añadió dimetilsulfóxido (DMSO). Después de una hora se cuantificó la absorbancia por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Los cultivos controles fueron los sembrados en membranas de PCL/quitosano.

5.2.3 Ensayo de viabilidad celular (citotoxicidad)

Para evaluar si la composición de los andamios co-electrohilados de PCL/quitosano con clorhidrato de tetraciclina en concentraciones de 1%, 3% y 5% afecta la viabilidad celular, se llevó a cabo el ensayo de azul de triazol (MTT) que

se basa en la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, la cual oxida la sal de tetrazolio (3-[4,5-dimetiltiazol-2-y] -2-5 bromuro difeniltetrazolio) a formazán, un producto insoluble de color azul. Las células derivadas del ligamento periodontal fueron cultivadas sobre los andamios co-electrohilados a una densidad celular de 5×10^3 por triplicado en placas de cultivo de 48 pozos, durante 1, 3, 5 y 7 días de cultivo con medio de cultivo DMEM, suplementado con 10% de SFB, y una solución de antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad. Después de cada periodo experimental, las células fueron incubadas con MTT (5mg/ml) a 37°C por 4 horas. Pasado este tiempo, el sobrenadante se retiró y se añadió DMSO. Después de una hora, se cuantificó la absorbancia por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Los cultivos controles fueron los sembrados en membranas de PCL/quitosano.

5.2.4 Ensayos de actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los andamios co-electrohilados de PCL/quitosano con clorhidrato de tetraciclina a concentraciones de 1%, 3% y 5% se determinó cualitativamente por el método de difusión de disco. Para los ensayos se utilizaron especies bacterianas del American Type Culture Collection (ATCC), enlistados en la tabla 2.

Tabla 2. Cepas bacterianas para los ensayos de actividad antimicrobiana.

Especie bacteriana	No. ATCC	Tolerancia al oxígeno
<i>Escherichia coli</i>	11775	Aerobia
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Aerobia
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> serotipo b	43718	Anaerobia

Como experimento preliminar se determinó la sensibilidad de las especies bacterianas de estudio de acuerdo a los lineamientos de la Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, antes NCCLS por sus siglas en inglés). Tomando en cuenta los resultados presentados en el **Anexo A**, donde se determinó la sensibilidad de las bacterias, se hicieron los ensayos de actividad antimicrobiana de la siguiente manera.

Las especies aerobias se cultivaron en agar enriquecido TSA (Trypticase Soy Agar, Bioxon, Becton Dickinson), suplementado con 5 mL de hemina y 0.3 µg/mL de vitamina K en una incubadora Felisa a 37°C, durante 24 horas. Cada una de las cepas fue propagada y transferida hasta obtener cultivos puros. Por otro lado la bacteria anaeróbica fue crecida en agar enriquecido HK (agar base para *Mycoplasma*, Becton Dickinson), suplementado con 5 mL de hemina, 0.3 µg/mL de vitamina K y 5% de sangre de carnero desfibrinada (Microlab®), y fue incubada en una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂ a 37°C, durante 7 días. Cada una de las cepas fue propagada y transferida por duplicado hasta obtener cultivos puros.

Obtenidos los cultivos puros, se recolecto cada cepa de la superficie del agar y fue sembrada por estriado en una nueva placa de agar enriquecido TSA en el caso de *E. coli* y *S. aureus*, y en medio agar enriquecido HK para *A. actinomycetemcomitans* en condiciones antes mencionadas. Se utilizaron andamios de 0.5 cm de diámetro con las concentraciones de 1%, 3% y 5% y de PCL/quitosano sin clorhidrato de tetraciclina como control. Los andamios fueron esterilizados previamente con radiación UV durante 20 minutos. Los andamios fueron colocados en las placas de agar enriquecido TSA con estriado de *E. coli* y *S. aureus* y fueron incubadas a 37°C, durante 24 horas; y en placas de agar enriquecido HK para *A. actinomycetemcomitans*, incubada en una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂ a 37°C, durante 7 días. Después del tiempo de incubación el efecto inhibitorio fue evaluado midiendo las zonas claras alrededor de las membranas donde las bacterias no fueron capaces de crecer, conocido como zonas de inhibición.

5.3 Análisis estadístico

Los datos presentados se expresan como la media \pm el error estándar de la media. Los resultados se obtuvieron por triplicado y fueron analizados por medio de la prueba de análisis de varianza (ANOVA) y comparados el control con los experimentales en los diferentes tiempos en los ensayos de adhesión y citotoxicidad; y la prueba posthoc de Tukey para comparaciones múltiples en los ensayos de actividad antimicrobiana mediante el programa GraphPad Prism 6.01.

6. RESULTADOS

Para determinar la biocompatibilidad de los andamios co-electrohilados se realizaron ensayos de adhesión y viabilidad celular. Se evaluó la adhesión celular de los fibroblastos a las diferentes membranas mediante el ensayo de MTT, a 12 y 24 horas (**Fig. 7**). De acuerdo con los resultados, pudimos observar que a las 12 horas las membranas co-electrohiladas con 1%, 3% y 5% presentan una adhesión celular similar al control. A las 24 horas de cultivo pudimos observar aumento en la adhesión celular en cada una de los andamios.

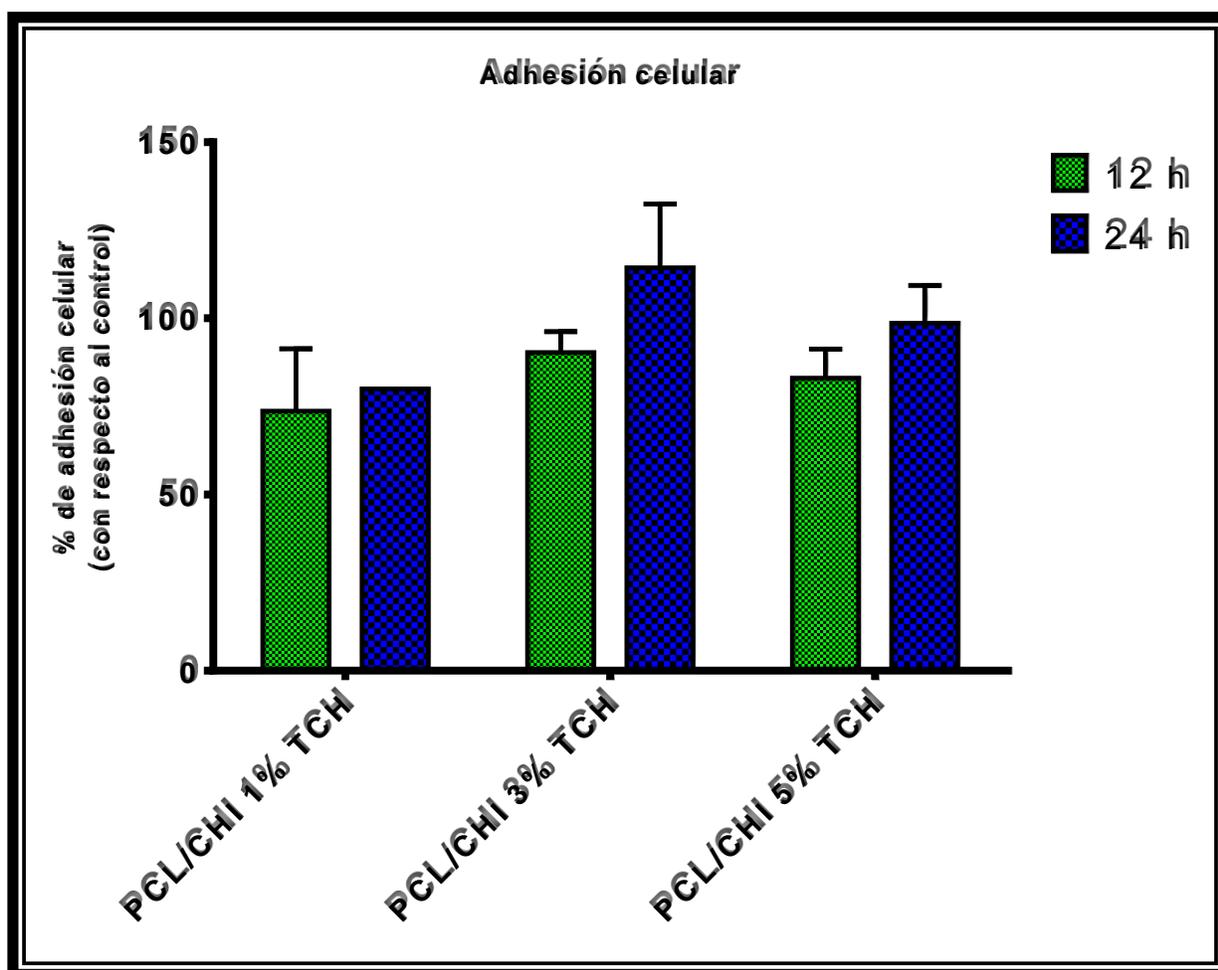


Figura 7. Ensayo de adhesión celular.

La citotoxicidad de las membranas co-electrohiladas fue evaluada por un análisis cuantitativo utilizando el ensayo de MTT, a 1, 3, 5 y 7 días de cultivo, donde la generación del formazán es proporcional a la actividad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial, por lo que una disminución en los valores de absorbancia puede estar relacionada con la toxicidad del material. Se utilizaron fibroblastos derivados del ligamento periodontal, teniendo en cuenta la aplicación prevista. En la **figura 8** podemos observar que la viabilidad celular va en aumento conforme los días de cultivo. Con respecto al control, los resultados nos indican que a partir del tercer día de cultivo, la viabilidad mejora en el caso de los andamios con concentraciones de 3% y 5% de tetraciclina, siendo mayores los valores de absorbancia. Los resultados obtenidos de los andamios con 1% de Tetraciclina no muestran diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan con el control.

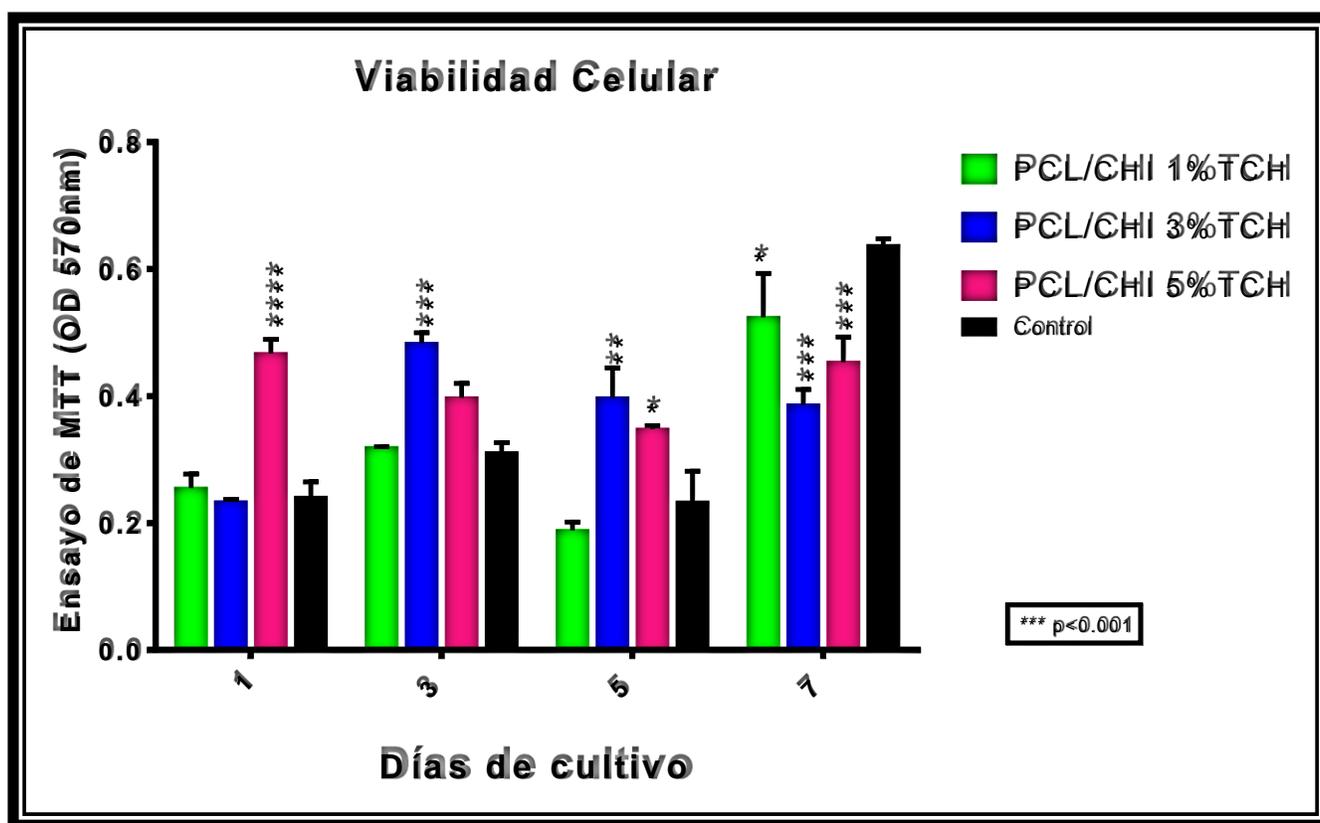


Figura 8. Ensayo de viabilidad celular con MTT.

La actividad antimicrobiana de la tetraciclina liberada de los andamios co-electrohilados se evaluó utilizando cepas bacterianas de *E. coli*, *S. aureus* y *A. actinomycetemcomitans*, y comparando las zonas de inhibición de las membranas en concentraciones del 1% al 5% de tetraciclina, utilizando como control membranas de fibras de PCL y nanopartículas de quitosano sin tetraciclina. Los resultados se muestran en las figuras 7, 8 y 9, donde podemos observar la presencia de halos de inhibición alrededor de las membranas con antibiótico en las especies bacterianas de prueba, debido a la difusión del fármaco en el agar y que al estar difundiendo al medio logra una inhibición del crecimiento bacteriano. En contraste, los andamios que no tienen antimicrobiano, no tuvieron un efecto inhibitorio y las bacterias presentaron un crecimiento normal.

Se evaluó la actividad antimicrobiana en cultivos de *E. coli* como especie representativa de bacterias Gram-negativa (**Fig. 9**). Las membranas con 1% presentaron un promedio de 13.5 mm de diámetro en los halos de inhibición, mientras que las que tienen nanopartículas con 3% de TCH presentaron un diámetro de 10.6 mm, y 12.0 mm las de 5% de TCH.

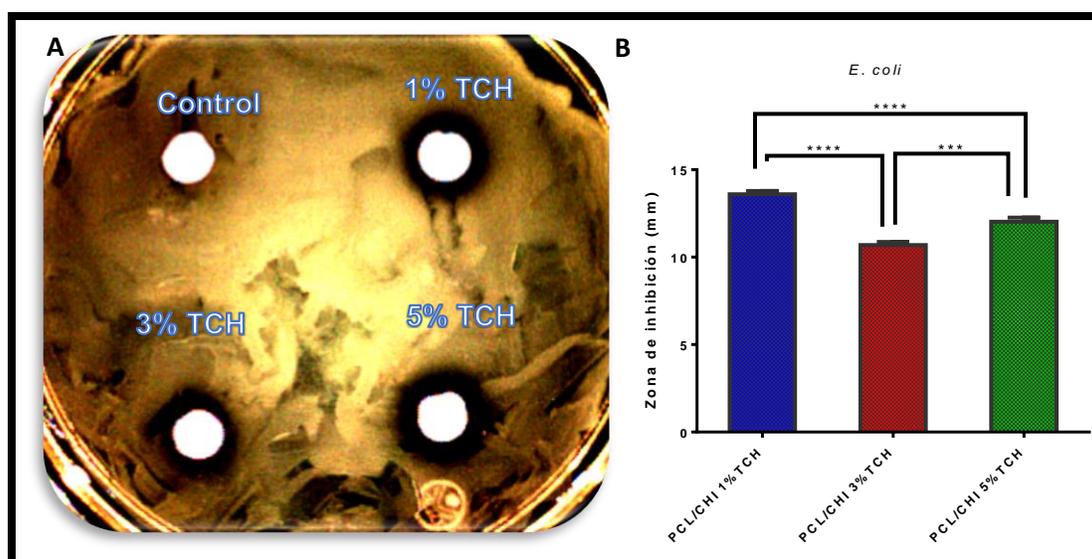


Figura 9.A) Halos de inhibición en bacteria *E. coli*. B) Análisis del diámetro promedio de halos de inhibición. (***) $p < 0.001$

Con respecto a los halos de inhibición de las membranas de 1%, 3% y 5% incubadas con *S. aureus* representativa de bacterias Gram-positivas, pudimos observar halos de mayor diámetro, con un promedio de 20.4 mm, 15.8 mm y 17.8 mm respectivamente (**Fig. 10**).

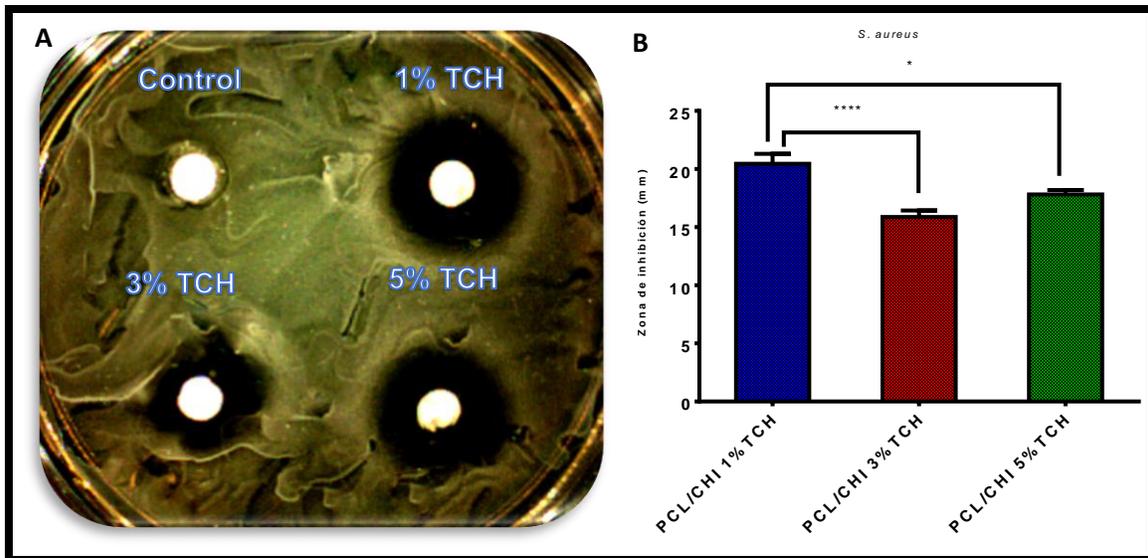


Figura 10. A) Halos de inhibición en bacteria *S. aureus*. B) Análisis del diámetro promedio de halos de inhibición (***) $p < 0.001$

Los andamios incubados con *A. actinomycetemcomitans* que es un microorganismo característico de enfermedad periodontal, también tuvieron un efecto antimicrobiano (**Fig. 11**), dando como resultado un promedio de 10.1 mm las membranas de 1% de TCH, 6.6 mm con 3% de TCH y 10.1 mm de diámetro las membranas con 5% de TCH.

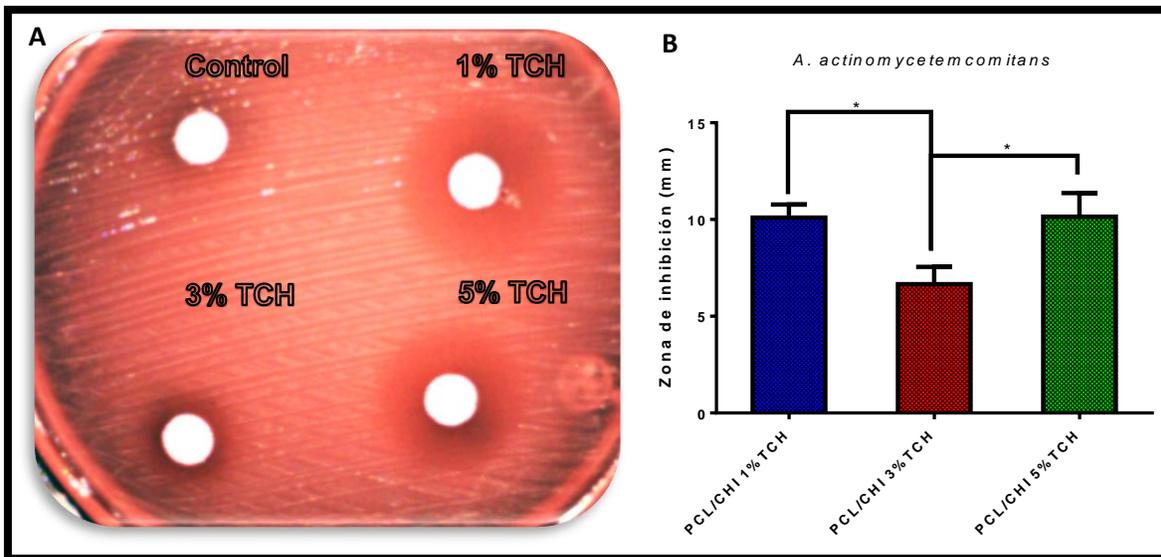


Figura 11. A) Halos de inhibición en bacteria *A. actinomycetemcomitans*. B) Análisis del diámetro promedio de halos de inhibición (* $p < 0.05$)

7. DISCUSIÓN

En años recientes se ha buscado el diseño de biomateriales que sean capaces de regenerar los tejidos así como controlar el ambiente para su aplicación en la regeneración periodontal. Por lo que este estudio se centra en evaluar la respuesta biológica de un material diseñado con la técnica de co-electrohilado, el cual es un sistema que integra dos técnicas, por un lado, el electrospinning para el diseño de andamios fibrilares, y por otro el electrospray para generar nanopartículas que contengan un antimicrobiano como lo es la tetraciclina.

En este estudio uno de los objetivos fue evaluar la biocompatibilidad de los andamios con ensayos de adhesión y viabilidad celular. Los andamios co-electrohilados han demostrado promover la adhesión celular, así como la proliferación celular, lo cual concuerda con estudios realizados previamente, donde las ventajas que ofrece la técnica de electrospinning para la formación de un fibras similares a la matriz extracelular de los tejidos, juegan un papel importante para guiar el comportamiento de las células ya sea en presencia de un material polimérico sintético como es el caso del PCL, natural como el quitosano, o un material compuesto.^{63, 77} Los andamios electrohilados de PCL han mostrado en estudios anteriores ser biocompatibles y promover la adhesión celular comparando con andamios sintetizados por otras técnicas, debido a la gran área superficial, porosidad e interconexión de poros, que se logra con la técnica.⁷⁸ En cuanto a los ensayos de viabilidad celular a los diferentes días de cultivo observamos que el material no es citotóxico, lo cual ha sido reportado en diferentes artículos, resultando el PCL ser un material aprobado por la FDA y, que por lo tanto se ha propuesto su uso en diferentes campos de la medicina regenerativa; por los resultados obtenidos andamios fabricados con este material los hacen otra opción como material para su uso en la regeneración periodontal, donde se ha buscado regular la proliferación celular y lograr regenerar el tejido a su arquitectura y función originales.^{55, 77-79}

Por otro lado, en este estudio, se evaluó la actividad antimicrobiana de las nanopartículas fabricadas por la técnica de electrospray integradas en las fibras electrohiladas, ya que se busca evitar la contaminación que puede existir después

de un tratamiento como la regeneración tisular guiada.⁸⁰ Por tanto en el campo de la bioingeniería de tejidos se ha buscado la liberación controlada de agentes antimicrobianos para su aplicación en la terapia periodontal, haciendo uso de tecnologías como el electrospray para el diseño de nanopartículas las cuales pueden estar cargadas con agentes antimicrobianos como la tetraciclina, para su liberación controlada en la zona afectada.⁸¹ En este estudio, las nanopartículas están integradas a un andamio fibrilar con lo cual se puede ofrecer una mayor retención del fármaco. Nuestros resultados nos muestran que se pueden utilizar diferentes concentraciones de tetraciclina para el diseño de estos andamios híbridos y que pueden tener un efecto antimicrobiano, ya que podemos observar zonas de inhibición alrededor de las membranas, al igual que podemos observar en otros estudios realizados previamente, donde los diámetros reportados son similares, por ejemplo en el caso de matrices de PCL con tetraciclina electrohiladas.^{82, 83} Por tanto, se demostró que la liberación de Tetraciclina de los andamios co-electrohilados tienen actividad antimicrobiana, lo cual es una ventaja en el tratamiento de la enfermedad periodontal evitando la colonización bacteriana que puede impedir la adecuada regeneración del tejido. Además de proteger el tejido de la invasión microbiana, la estructura nanofibrilar de PCL puede promover la regeneración del tejido.

El uso de la nanotecnología en la medicina y más específicamente en el campo de liberación de fármacos ha tomado su mayor auge en los últimos años. Específicamente se ha buscado el uso de nanopartículas (10-1000 nm) para reducir la toxicidad y efectos adversos de los diversos tipos de fármacos. La técnica de electrospraying para el diseño de micro y nanopartículas da como resultado gotas altamente cargadas, por lo que se evita su agregación, promoviendo su dispersión en el colector. Las partículas nanométricas proporcionan una mayor área de superficie aumentando así la liberación uniforme de la tetraciclina encapsulada³¹; la integración de las nanopartículas en fibras electrohiladas ha mostrado que se puede controlar el tiempo de liberación del fármaco, reportándose que en las primeras horas hay una liberación de estallido, en la cual se libera la mayor cantidad de fármaco en las primeras horas, lo cual ocurre también en productos como las fibras

con tetraciclina de uso periodontal (Actisite®).⁸⁴ En el caso de los andamios co-electrohilados, la cinética de liberación de la tetraciclina depende de la morfología y distribución de las nanopartículas en la red de nanofibras de PCL por el efecto de retención del fármaco, lo cual ayuda a tener una liberación controlada del fármaco en la bolsa periodontal.^{75, 85}

8. CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó la respuesta biológica de los andamios fibrilares de PCL con nanopartículas de quitosano cargadas con tetraciclina en concentraciones de 1% a 5%, evaluando la biocompatibilidad y actividad antimicrobiana.

Se lograron caracterizar los andamios compuestos de nanofibras de PCL con nanopartículas de quitosano cargadas con clorhidrato de tetraciclina en diferentes concentraciones por medio de la técnica de co-electrohilado.

Los andamios de PCL/Quitosano/TCH mostraron una óptima biocompatibilidad al estar en presencia de fibroblastos de ligamento periodontal indicando que las concentraciones de tetraciclina no son tóxicas.

Los andamios de PCL/Quitosano/TCH mostraron tener un efecto antimicrobiano que garantiza su posible uso en la terapia periodontal.

9. Referencias

1. Kim JH, Park CH, Perez RA, Lee HY, *et.al.* Advanced biomatrix designs for regenerative therapy of periodontal tissues. *J Dent Res.* 93(12): 1203-1211, 2014
2. Nanci A., Boss D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontology 2000* 40:11-28, 2006.
3. Hughes FJ, Ghuman M, Talal A. Periodontal regeneration: a challenge for the tissue engineer? *Proc Inst Mech Eng H.* 224(12): 1345-1358, 2010.
4. Barczyk M, Bolstad A. I., Gullberg D. Role of integrins in the periodontal ligament: organizers and facilitators. *Periodontology 2000* 63:29-47, 2013.
5. Bartold M.P., McCulloch A. Information generation and processing systems that regulate periodontal structure and function. *Periodontology 2000* 63:7-13, 2013.
6. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Northwest Dent.* 79(6): 31-35, 2000.
7. Cafiero C, Matarasso S. Predictive, preventive, personalised and participatory periodontology: 'the 5Ps ages' has already started. *EPMA J.* 4(1), 2014.
8. Socransky SS. Microbiology of periodontal disease –present status and future considerations. *J Periodontol.* 48(9): 497-504, 1977.
9. Socransky S, Haffajee A. Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000.* 38: 135-187, 2005.
10. Sundararaj S, Thomas M, Peyyala R, Dziubla T. Design of a multiple drug delivery system directed at periodontitis. *Biomaterials.* 34: 8835-8842, 2013
11. Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration base don molecular and cell biology. *Periodontol 2000.* 24: 253-269, 2000.
12. Wolf Herbert F, Rateitschak Klaus H. Clinical atlas of dental medicine. Periodontology. Georg Thieme Verlag. 309-318, 2005.

13. Chahal GS, Chhina K, Chhabra V, Bhatnagar R, Chahal A. Effect of citric acid, tetracycline, and doxycycline on instrumented periodontally involved root surfaces: a SEM study. *J Indian Soc Periodontol*. 18(1): 32-37, 2014.
14. Ramseier CA, Rasperini G, Batia S, Giannobile WV. Advanced reconstructive technologies for periodontal tissue repair. *Periodontol 2000*. 59(1): 185-202, 2012.
15. Iwata T, Yamato M, Ishikawa I, Ando T, Okano T. Tissue engineering in periodontal tissue. *Anat Rec (Hoboken)*. 297(1): 16-25, 2014.
16. Benatti BB, Silvério KG, Casati MZ, Sallum EA, et al. Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering utilizing periodontal ligament cells. *J Biosci Bioeng*. 103(1): 1-6, 2007.
17. Slots J, Ting M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 28: 106-176, 2002.
18. Quirynen M, Teughels W, De Soete M, Van Steenberghe D. Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontology 2000*. 28: 72-90, 2002.
19. Goodson JM. Gingival crevice fluid flow. *Periodontology 2000*. 31: 43-54, 2003.
20. Greenstein G. Clinical significance of bacterial resistance to tetracyclines in the treatment of periodontal diseases. *J Periodontol*. 66(11): 925-932, 1995.
21. Ciancio SG. Tetracyclines and periodontal therapy. *J Periodontol*. 47(3): 155-159, 1976.
22. Patil V, Mali R, Mali A. Systemic anti-microbial agents used in periodontal therapy. *J Ind Soc Perio*. 17(2): 162-168, 2013.
23. Nelson ML, Levy SB. Comprehensive biotechnology. 2da. edición, vol. 3: Industrial Biotechnology and Commodity Products. 269-283, 2011.
24. Webster G, Del Rosso JQ. Anti-inflammatory activity of tetracyclines. *Dermatol Clin*. 25(2): 133-135, 2007.

25. Dalm D, Palm GJ, Aleksandrov A, Simonson T, Hinrichs W. Nonantibiotic properties of tetracyclines: structural basis for inhibition of secretory phospholipase A2. *J Mol Biol.* 398(1): 83-96, 2010.
26. Acharya MR, Venitz J, Figg WD, Sparreboom A. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug Resist Updat.* 7(3): 195-208, 2004.
27. Spadin AN, Fleischmajer R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. *J Am Acad Dermatol.* 54(2): 258-265, 2006.
28. Sinha S, Kumar S, Dagli N, Dagli RJ. Effect of tetracycline HCL in the treatment of chronic periodontitis – A clinical study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 4(3): 149-153, 2014.
29. Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet.* 354(suppl1): SI32- SI34, 1999. Dodwad V, Vaish S, Mahanjan A, Chhokra M. Local drug delivery in periodontics: A strategic intervention. *Int J Pharm Pharmc Scie* 4:30-34, 2012.
30. Sokolsky-Papkov M, Agashi K, Olaye A, Shakesheff K, Domb AJ. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 59(4-5): 187-206, 2007.
31. Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol.* 6(1): 13-22, 2011.
32. Liu S, He Z, Xu G, Xiao X. Fabrication of polycaprolactone nanofibrous scaffolds by facile phase separation approach. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 44: 201-208, 2014.
33. Zhang S. Emerging biological materials through molecular self-assembly. *Biotechnol Adv.* 20(5-6):321-339, 2002.
34. Paramonov SE, Jun HW, Hartgerink JD. Self-assembly of peptide-amphiphile nanofibers: the roles of hydrogen bonding and amphiphilic packing. *J Am Chem Soc.* 128(22): 7291-7298, 2006.

35. Lu G, Liu S, Lin S, Kaplan DL, Lu Q. Silk porous scaffolds with nanofibrous microstructures and tunable properties. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 120: 28-37, 2014.
36. Lou T, Wang X, Song G. Fabrication of nano-fibrous poly(L-lactic acid scaffold reinforced by Surface modified chitosan micro-fiber. *Int J Biol Macromol*. 61:353-358, 2013.
37. Lou T, Wang X, Gu Z, Yang Z. Structure and properties of PLLA/ β -TCP nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 26:34, 2015.
38. Sun B, Long YZ, Zhang HD, Li MM, et. al. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Prog Poly Scie*. 39(5): 862-890, 2014.
39. Sill TJ, von Recum H. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 29(13):1989-2006, 2008.
40. Wang B, Wang Y, Yin T, Yu Q. Applications of electrospinning technique in drug delivery. *Chem Eng Comm*. 197(10): 1315-1338, 2010.
41. Bhardwaj N, Kundu S. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotech Adv* 28(3): 325-347, 2010.
42. Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, et.al. Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev*. 59(14): 1413-1433, 2007.
43. Guarino V, Khodir WK, Ambrosio L. Biodegradable microparticles and nanoparticles by electro spraying techniques. *J Appl Biomater Funct Mater*. 10(3): 191-196, 2012.
44. Arya N, Chakraborty S, Dube N, Katii DS. Electro spraying: a facile technique for synthesis of chitosan-based micro/nanospheres for drug delivery applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 88(1): 17-31, 2009.
45. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release*. 100(1): 5-28, 2004.

46. Bock N, Dargaville TR, Woodruff MA. Electro spraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art. *Progr Pol Sci.* 37: 1510-1551, 2012.
47. Chakraborty S, Liao IC, Adler A, Leong KW. Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems. *Adv Drug Delv Rev.* 61(12): 1043-1054, 2009.
48. Levorson EJ, Raman Sreerexha P, Chennazhi KP, Kasper FK, *et.al.* Fabrication and characterization of multiscale electrospun scaffolds for cartilage regeneration. *Biomed Mater.* 8(1): 2013.
49. Zhang Q, Lv S, Lu J, Jiang S, Lin L. Characterization of polycaprolactone/collagen fibrous scaffolds by electrospinning and their biactivity. *Int J Biol Macromol.* 76:94-101, 2015.
50. Sekiya N, Ichioka S, Terada D, Tsuchiya S, Kobayashi H. Efficacy of a poly glycolic acid (PGA)/collagen composite nanofibre scaffold on cell migration and neovascularisation in vivo skin defect model. *J Plast Surg Hand Surg.* 47(6): 498-502, 2013.
51. Yang D, Li Y, Nie J. Preparation of gelatin/PVA nanofibers and their potential application in controlled release of drugs. *Carbo Pol.* 69:538-543, 2007.
52. Gomes SR, Rodrigues G, Martins GG, Roberto MA, *et.al.* In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: a comparative study. 46: 348-358, 2015.
53. Meng ZX, Xu XX, Zheng W, Zhou HM, *et.al.* Preparation and characterization of electrospun PLGA/gelatin nanofibers as a potential drug delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 84(1): 97-102, 2011.
54. Noh HK, Lee SW, Kim JM, Oh JE, *et.al.* Electrospinning of chitin nanofibers: degradation behavior and cellular response to normal human keratinocytes and fibroblasts. *Biomaterials.* 27(21): 3934-3944, 2006.
55. Yao Y, Wang J, Cui Y, Xu R, *et.al.* Effect of sustained heparin release from PCL/chitosan hybrid small-diameter vascular grafts on anti-thrombogenic property and endothelialization. *Acta Biomater.* 10(6): 2739-2749, 2014.

56. An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. *Biomaterials*. 32(1): 65-74, 2011.
57. Maretschek S, Greiner A, Kissel T. Electrospun biodegradable nanofiber nonwovens for controlled release of proteins. *J Control Release*. 127(2): 180-187, 2008.
58. Wang H, Ma X, Li Y, Jiang S, *et.al*. Synthesis, antimicrobial and release of chloranphenicol loaded poly(L-lactic acid)/ZrO₂ nanofibrous membranes. *Int J Biol Macromol*. 62: 494-499, 2013.
59. Almeria B, Fahmy TM, Gomez A. A multiplexed electro spray process for single-step synthesis of stabilized polymer particles for drug delivery. *J Control Release*. 154(2): 203-210, 2011.
60. Xue J, He M, Liu H, Niu Y, *et.al*. Drug loaded homogeneous electrospun PCL/gelatin hybrid nanofibers structures for anti-infective tissue regeneration membranes. *Biomaterials*. 34(35): 9395-9405, 2014.
61. Zander NE, Orlicki JA, Rawlett AM, Beebe TP Jr. Electrospun polycaprolactone scaffolds with tailored porosity using two approaches for enhanced cellular infiltration. *J Mater Sci Mater Med*. 24(1): 179-187, 2013.
62. Woodruff MA, Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century. *Progress Pol Sci*. 35: 1217-1256, 2010.
63. Lowery JL, Datta N, Rutledge GC. Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly(epsilon-caprolactone) fibrous mats. *Biomaterials*. 31(3):491-504, 2010.
64. Chen X, Fu X, Shi JG, Wang H. Regulation of the osteogenesis of pre-osteoblasts by spatial arrangement of electrospun nanofibers in two- and three-dimensional environments. *Nanomedicine*. 9(8):1283-1292, 2013.
65. Kharaziha M, Fathi MH, Edris H. Development of novel aligned nanofibrous composite membranes for guided bone regeneration. *J Mech Behav Mater*. 24: 9-20, 2013.

66. Luong-Van E, Grøndahl L, Chua KN, Leong KW, *et.al.* Controlled release of heparin from poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers. *Biomater* 27: 2042-2050, 2006.
67. Dash TK, Konkimalla VB. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *J Control Release*. 158(1): 15:33, 2012.
68. Dong Y, Liao S, Ngiam M, Chan CK, *et.a.* Degradation behaviors of electrospun resorbible polyester nanofibers. *Tissue Eng Part B Rev*. 15(3): 333-351, 2009.
69. Lam CX, Hutmacher DW, Schantz JT, Woodruff MA, *et.al.* Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 90(3): 906-919, 2009.
70. Azimi B. Nourpanah P, Rabiee M, Arbab S. Poly (ϵ -caprolactone) fiber: An overview. *J Eng Fibers Fabrics*. 9(3): 74-90, 2014.
71. Ding F, Deng H, Du Y, Shi X, *et.al.* Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. *Nanoscale*. 6(16): 9477-9493, 2014.
72. Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs*. 13(3): 1133-1174, 2015.
73. Geng X, Kwon OH, Jang J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*. 26(27): 5427-5432, 2005.
74. Ignatova M, Monolova N, Rashkov I. Electrospun antibacterial chitosan-based fibers. *Macromol Biosci*. 13(7), 860-872, 2013.
75. Sendil D. Gürsel I, Wise DL, Harsirci V. Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *J Control Release*. 59(2): 207-2017, 1999.
76. Shi J, Vortuba AR, Farokhzad OC, Langer R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from Discovery to applications. *Nano Lett*. 10(9): 3223-3230, 2010.

77. Li D, Wu T, He N, Wang J, *et.al.* Three-dimensional polycaprolactone scaffold via needless electrospinning promotes cell proliferation and infiltration. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 121: 432-443, 2014.
78. Guarino V, Alvarez-Perez MA, Cirillo V, Ambrosio L. hMSC interaction with PCL and PCL/gelatin bplataforms: A comparative study on films and electrospun membranes. *J Bioact Comp Pol*. 26(2): 144-160, 2011.
79. Cipitria A, Skelton A, Dargaville TR, Dalton P, Hutmacher DW. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review. *J Mater Chem*. 21(26): 9381-9792, 2011.
80. Mombelli A, Lang NP, Nyman S. Isolation of periodontal species after guided tissue regeneration. *J Periodontol*. 64(11 Suppl): 1171-1175, 1993.
81. Govender S, Luthcman D, Pillary V, Chetty DJ, Govender T. Enhancing drug incorporation into tetracycline-loaded chitosan microspheres for periodontal therapy. *J Microencapsul*. 23(7): 750-761, 2006.
82. Alhusein N, Blagbrough IS, De Bank PA. Electrospun matrices for localised controlled drug delivery: release of tetracycline hydrochloride from layers of polycaprolactone and poly (ethylene-co-vinyl acetate). *Drug Deliv Transl Res*. 2(6): 477-488, 2012.
83. Cheng CF, Lee YY, Chi LY, Chen YT, *et. al.* Bacterial penetration through antibiotic-loaded guided tissue regeneration membranes. *J Periodontol*. 80(9): 1471-1478, 2009.
84. Kenawy el-R, Bowlin GL, Mansfield K, Layman J, *et. al.* Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly (ethylene-co-vinylacetate), poly (lactic acid), and a blend. *J Control Release*. 81(1-2): 57-64, 2002.
85. Wan Abdul Khodir WK, Guarino V, Alvarez-Pérez MA, Cafiero C, Ambrosio L. Trapping tetracycline-loaded nanoparticles into polycaprolactone fiber networks for periodontal regeneration therapy. *J Bioact Compat Polym*. 28(3): 258-273, 2013.

10. ANEXO A

Previo a los ensayos de actividad bacteriana se evaluó la sensibilidad de las cepas de estudio al clorhidrato de tetraciclina, de acuerdo con los lineamientos establecidos por la Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, antes NCCLS por sus siglas en inglés).

Las cepas de *E. coli* y *S. aureus* fueron sembradas en placas con agar enriquecido TSA (Trypticase Soy Agar, Bioxon, Becton Dickinson), suplementado con 5 mL de hemina y 0.3 µg/mL de vitamina K en una incubadora Felisa a 37°C, durante 24 horas; en el caso de *A. actinomycetemcomitans* fue sembrada en placas con agar enriquecido HK (agar base para *Mycoplasma*, Becton Dickinson), suplementado con 5 mL de hemina, 0.3 µg/mL de vitamina K y 5% de sangre de carnero desfibrinada (Microlab®), y fue incubada en una cámara de anaerobiosis con ambiente de 80% N₂, 10% CO₂ y 10% H₂ a 37°C, durante 7 días. En todas las cepas se utilizaron las placas con el medio correspondiente sin antibiótico como control y placas con tres concentraciones distintas de tetraciclina de acuerdo con lo establecido por la CLSI (3, 8 y 16 µg/mL, para bacterias susceptibles, intermedias y resistentes respectivamente) por triplicado.

Una vez transcurridos los tiempos de incubación se realizó la observación de cada placa donde se sembraron las cepas con las diferentes concentraciones de tetraciclina (**figuras 12, 13, 14**) No hubo crecimiento de colonias en las placas con antibiótico, por lo que concluimos que ninguna de las cepas tenía resistencia al antibiótico. Por el contrario si se observó gran crecimiento de las mismas cepas que fueron sembradas en las placas control, que no contenían antibiótico. Estos resultados muestran que la actividad antimicrobiana del antibiótico analizado es efectiva contra las cepas de estudio. Esto se tomó en cuenta para los ensayos de actividad antimicrobiana.

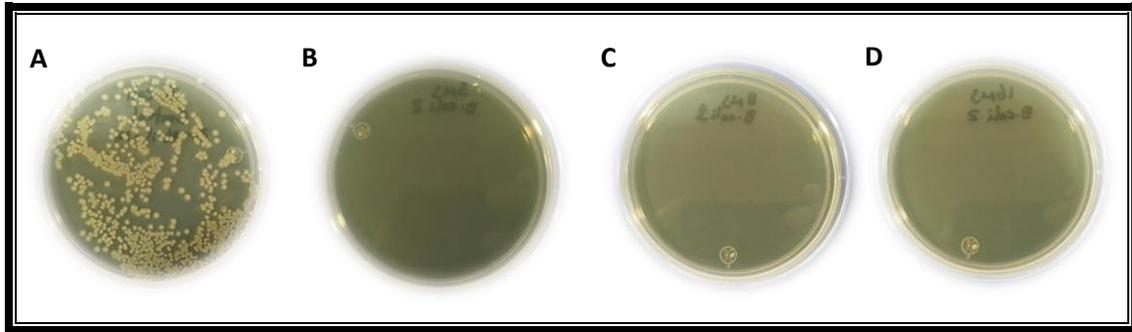


Figura 12. *E. coli* sembrada en platos A) sin antibiótico (control); B) 3 µg/ml; C) 8 µg/ml; D) 16 µg/ml de TCH

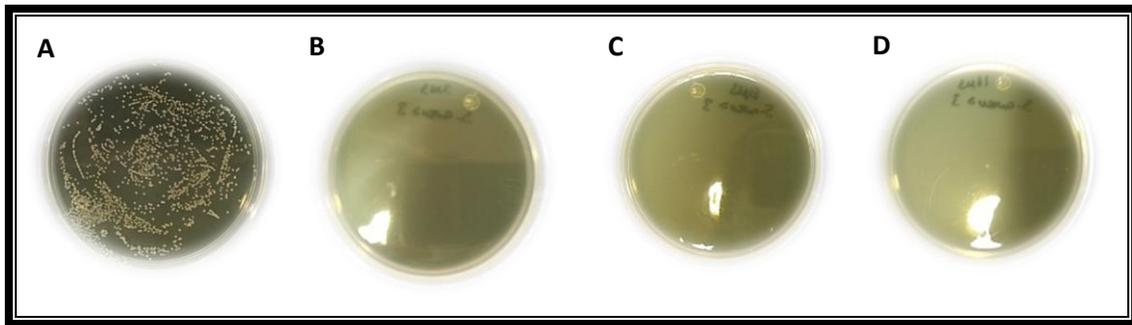


Figura 13. *S. aureus* sembrada en platos A) sin antibiótico (control); B) con 3 µg/ml; C) 8 µg/ml de TCH; y 16 µg/ml de TCH.

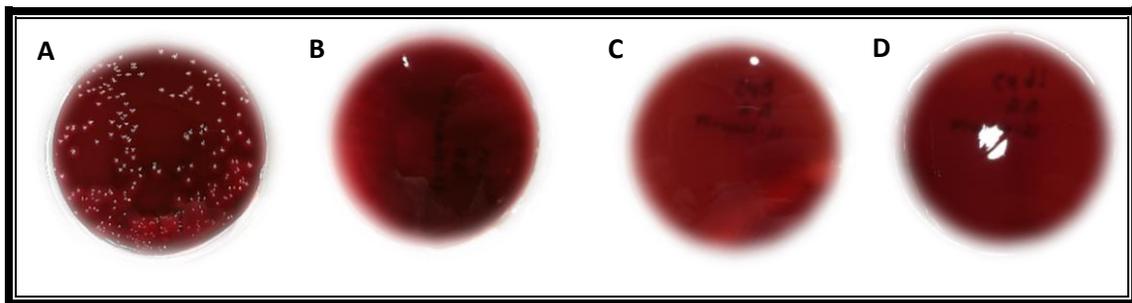


Figura 14. *Actinomyces comitans* sembrada en platos A) sin antibiótico (control); B) 3 µg/ml; C) 8 µg/ml de TCH; y 16 µg/ml de TCH