



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

PROGRAMA DE TITULACIÓN POR ALTO PROMEDIO (TAP)

**DESARROLLO DE PELÍCULAS DELGADAS DE
PLA/CaCO₃ COMO ANDAMIO PARA REGENERACIÓN
TISULAR GUIADA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

DIANA ROCÍO GARCÉS MONDRAGÓN

TUTOR: Dr. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 Dios primero

Por haber hecho posible tener el apoyo de mi familia hasta llegar al final de esta etapa, pues nos mantuvo juntos y con salud y además él proporcionó los medios que necesité para hacer más fácil mi estudio y me acompañó a lo largo de estos cinco años acomodando el universo a mi favor para salir adelante.

A mi familia

No encuentro palabras para agradecerles el apoyo y amor incondicional que me han brindado y que se privaron de cosas para dárme las y que yo tuviera lo necesario para salir adelante.

A mi mamá Irma, por instruirme en la vida y enseñarme valores tan importantes que en la actualidad lamentablemente se han perdido en nuestra sociedad. Mujer guerrera que estudió mucho para darme lo mejor y que yo tuviera una vida diferente. Ahora me muestra lo importante que es en la vida prepararse y aspirar a lo más alto. Gracias a ti por apoyarme siempre en mis proyectos profesionales y darme la confianza... ¡No sé de qué manera recompensar todo lo que me has brindado, empezando por la vida...TE AMO!!!!

A mi papá Antonio, quien ha trabajado mucho para poderme dar una mejor vida y que gracias a él me forme el carácter para no dejarme de nada ni de nadie...y que no soy quien para juzgar a las personas porque nadie te prepara para la vida, más sin embargo hay que quedarse con lo mejor de las personas y lo malo cambiarlo. El haberme exigido para terminar la escuela y ser una mujer independiente y por último que, si no fuera por él, yo no tendría quizás las metas profesionales ni querer ser mejor persona en mi futuro...

A mi hermano Eduardo, primero, porque teniendo un hermano, aprendí a ser compartida y no egoísta. Que si bien uno con los años crece y adquiere más responsabilidades no olvido los momentos que tuvimos juntos muy divertidos cuando éramos niños. Lamentablemente a veces nos cegamos por la rutina y nos olvidamos de que los mejores momentos son gratis y dejamos de ser pacientes... él sabe que yo esté donde esté, estaré para lo que necesita y espero que se quede con lo bueno de nuestra familia y lo malo lo cambie...que un hijo está para mejorar en todos los aspectos la generación...

A mi abuela Romelia, mujer humilde con muchos valores...que, si no tiene una profesión, sí tiene las ganas de salir adelante e inculcarme valores que han hecho de mí una mujer profesional con valores. Segunda madre has sido y siempre al pendiente de cada logro o tropiezo que doy, pero siempre con tu dulzura me levantas y me demuestras que pase lo que pase no debo olvidar mis metas y no dejar la humildad... Mis logros también van para ti y esté donde yo esté, tu educación no la pienso olvidar. ¡TE AMO!!!

A mis mejores amigos,

Que me han demostrado con los hechos realmente que tengo su aprecio, que agradezco el buen corazón que tienen y que siempre sus consejos han sido para bien mío. No tengo palabras ni forma de agradecerle a Dios por darme tantas razones de sonreírle a la vida, entre ellos por ustedes, porque sé que son pocas las personas que podrían tener amigos como los que tengo.

Siempre apoyando mis planes y claro, diciéndome las ventajas y desventajas de esas decisiones, no siendo egoístas y dándome consejos pensando en lo que mis padres podrían sentir o me dirían. Gracias por ser parte de mi vida y sé que dios me ha ayudado a ser prudente porque no me equivoqué en escogerlos a ustedes como mi familia.

A mis profesores

Que más que una clase me aportaron la inquietud de seguir preparándome. Gracias por sus consejos profesionales y de prepararse también para la vida. Algunos me inspiraron a ser si no la mejor, por lo menos de las mejores dentistas del mundo

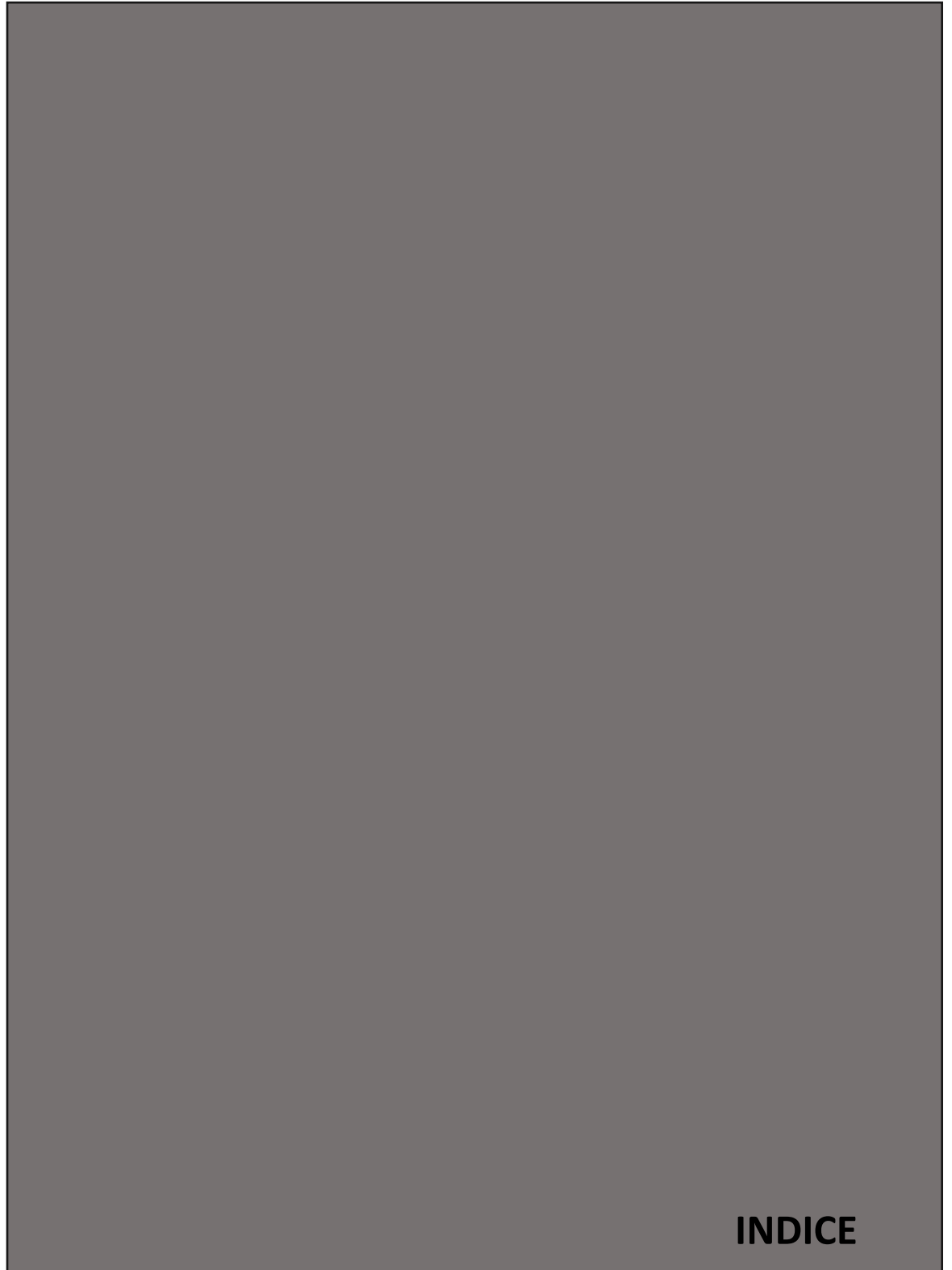
A mi Universidad

Al Dr. Fernando Suaste Olmos por la asesoría, así como el excelente apoyo técnico que me brindo durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Agradezco el apoyo por parte del programa DGAPA-UNAM por el financiamiento al proyecto PAPIIT IT203618 que me ha permitido la realización de esta investigación.

La formación académica brindada fue la calidad y calidez. Es un orgullo ser universitario, portar tus colores, azul y oro, poniendo en alto el nombre de ti "UNAM".

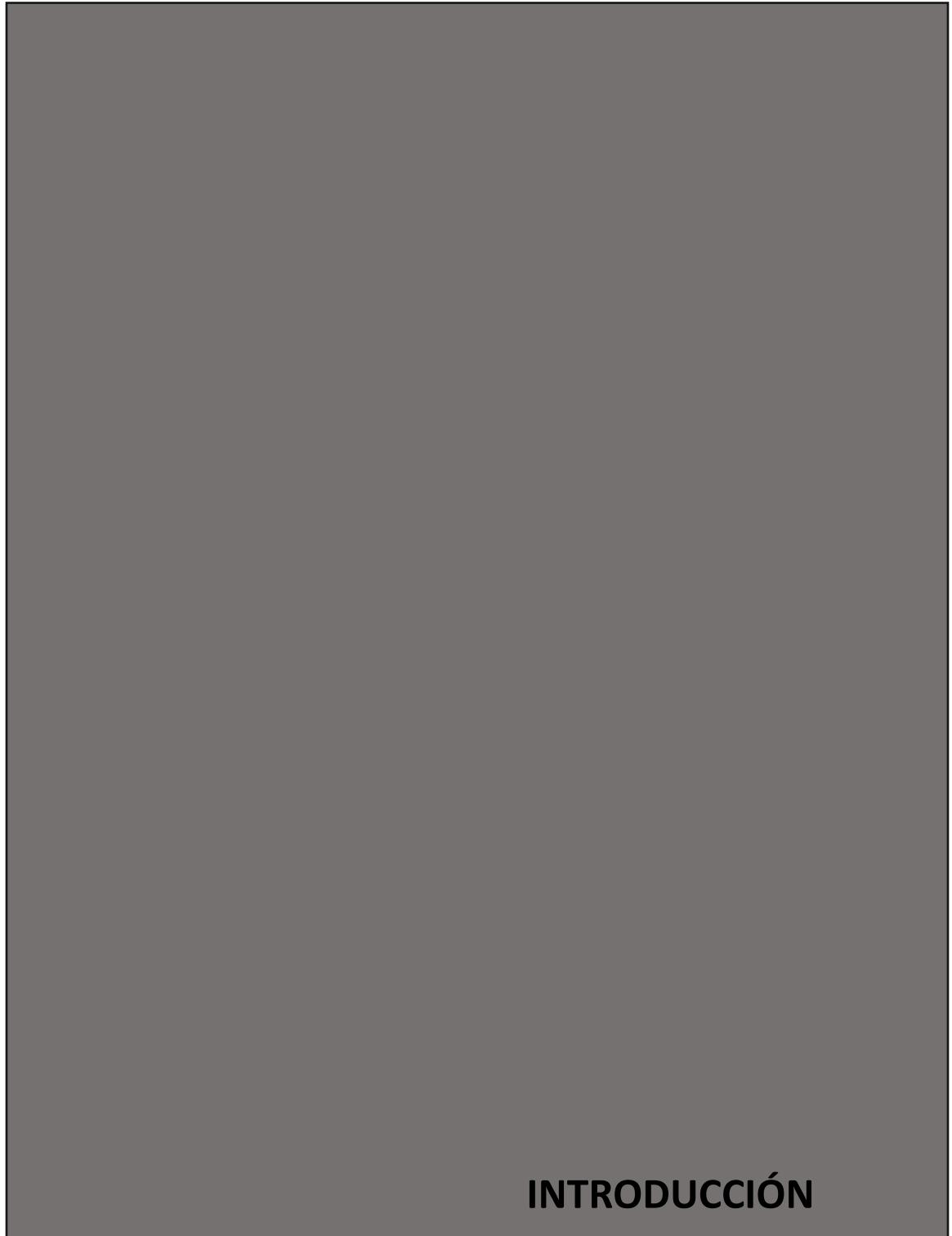
"Por mi raza hablará el espíritu"



INDICE

| | |
|----------------------------------------------------------|----|
| Introducción..... | 8 |
| Periodonto..... | 10 |
| Encía..... | 10 |
| Ligamento periodontal..... | 11 |
| Cemento radicular..... | 11 |
| Hueso alveolar..... | 12 |
| Gingivitis..... | 13 |
| Periodontitis..... | 14 |
| Periodontitis crónica..... | 14 |
| Periodontitis agresiva | 14 |
| ESTRATEGIAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA PERIODONTITIS..... | 15 |
| NUEVAS ESTRATEGIAS..... | 16 |
| INGENIERIA DE TEJIDOS..... | 16 |
| 1) CELULAS..... | 17 |
| - Células troncales mesenquimales..... | 17 |
| - Fuentes de obtención de las células troncales..... | 18 |
| - Fibroblastos de la pulpa..... | 18 |
| 2) DISEÑO DEL ANDAMIO..... | 18 |
| 3) LOS FACTORES O INDUCTORES ESPECIFICOS..... | 19 |
| Justificación..... | 21 |
| Pregunta de investigación..... | 23 |
| Objetivos..... | 25 |
| Objetivo general..... | 26 |
| Objetivos específicos..... | 26 |
| Hipótesis..... | 27 |
| Hipótesis..... | 28 |
| Hipótesis nula..... | 28 |
| Materiales y métodos..... | 29 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| Síntesis de la película delgada de PLA/CaCO ₃ | 30 |
| Selección de pacientes..... | 30 |
| Extracción dental..... | 31 |
| Obtención del tejido pulpar..... | 31 |
| Aislamiento de las células de pulpa dental..... | 31 |
| Procesamiento de las células delgadas para cultivo celular..... | 32 |
| Ensayo de adhesión celular | 32 |
| Ensayo de viabilidad celular (citotoxicidad) | 33 |
| Resultados..... | 35 |
| Discusión..... | 40 |
| Conclusión..... | 43 |
| Referencias..... | 45 |



INTRODUCCIÓN

Las enfermedades son los principales problemas de salud pública en la mayor parte del mundo. El patrón de enfermar se ha transformado en todo el mundo esto debido principalmente a los estilos de vida cambiantes, que incluyen las dietas ricas en azúcares, el uso generalizado de tabaco y el aumento del consumo del alcohol. Además de los determinantes socio-ambientales; las enfermedades bucales están muy relacionadas con estos estilos de vida. Las enfermedades bucales son consideradas como uno de los principales problemas de salud pública debido a su alta prevalencia e incidencia en todas las regiones del mundo, y como en todas las enfermedades, la mayor carga es en las poblaciones desfavorecidas y marginadas socialmente. Las graves repercusiones en términos de dolor y sufrimiento, deterioro de la función y el efecto en la calidad de vida también debe ser considerado. El tratamiento de las enfermedades bucales es extremadamente costoso y no es factible en la mayoría de los países de ingresos bajos y medios.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que las enfermedades bucales son la cuarta causa más costosa de tratar, en nuestro país se encuentran entre las de mayor demanda de atención en los servicios de salud del país.

En países de altos ingresos, la carga de la enfermedad oral se ha abordado mediante la creación de avanzados servicios de salud bucodental que ofrecen principalmente el tratamiento a los pacientes. La mayoría de los sistemas se basan en la demanda de atención recibida por los odontólogos privados, aunque algunos países de altos ingresos han organizado servicios públicos de salud bucodental en los sistemas. En la mayoría de los países de bajos y de ingresos medios, la inversión en el cuidado de la salud oral es baja y los recursos se asignan principalmente a la atención oral de emergencia y alivio del dolor.

De acuerdo con la OMS la salud bucal puede definirse como la ausencia de dolor orofacial crónico, cáncer de boca o garganta, úlceras bucales, defectos congénitos como labio leporino o paladar hendido, enfermedades periodontales, caries bucal y pérdida de dientes, así como otras enfermedades y trastornos que afectan a la cavidad bucal.

Diferentes investigaciones han mostrado que más de 120 enfermedades sistémicas se originan en la cavidad bucal. Las enfermedades bucales se han asociado con compromiso nutricional, cáncer, xerostomía, neumonía, bacteriemia, enfisema, problemas del corazón, diabetes, complicaciones en cirugía entre otras. Las enfermedades bucales aumentan el riesgo de enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, la diabetes mellitus y enfermedades respiratorias.

La caries dental y la enfermedad periodontal son dos de los problemas más significativos de la Salud Pública Bucal. Sin embargo, no son las únicas enfermedades y trastornos que se presentan en la cavidad bucal también existen los trastornos del desarrollo y de la erupción de los dientes, enfermedades de la pulpa, y los tejidos periapicales, anomalías dentofaciales, lesiones en la mucosa bucal, cáncer de la cavidad oral y maloclusiones que afectan a la población.

Periodonto

El periodonto normal provee el soporte necesario para mantener al órgano dentario en función. Este aparato consiste básicamente en cuatro componentes: encía, ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular. Cada uno de estos componentes es distinto en su localización, arquitectura, composición bioquímica y química. Sin embargo, todos estos componentes funcionan en conjunto como una sola unidad. Investigaciones recientes han mostrado que la matriz extracelular de los componentes del periodonto, pueden influenciar las actividades celulares de estructuras adyacentes. Por lo tanto, los cambios patológicos que suceden en este pueden tener injerencia en el mantenimiento, reparación y regeneración de otros componentes del periodonto.

ENCÍA

La mucosa oral consiste en tres zonas: la encía, la mucosa masticatoria y la mucosa bucal. La encía a su vez está anatómicamente dividida en marginal, insertada e interdental. La

encia marginal, es el borde de tejido que rodea al cuello del diente en forma de collar, ésta mide en condiciones normales cerca de 1 mm de grosor y forma el tejido suave de la pared del surco gingival. El surco gingival es el espacio alrededor del órgano dentario, tiene forma de V, el cual permite introducir 1 mm la sonda periodontal. La encía insertada es la continuación de la encía gingival, es firme, resilente y adherida al periostio del hueso alveolar. La encía interdental, ocupa el espacio inter-proximal por debajo del área de contacto, ésta presenta forma piramidal y tiene forma de “col”. El tejido conectivo de la encía es conocido como lámina propia y consiste de dos capas: 1) capa de la papila por debajo del epitelio y 2) capa reticular que es la continuación del periostio alveolar. El tejido conectivo posee un compartimiento celular y extracelular compuesto de fibras y sustancia fundamental. La sustancia fundamental rellena el espacio entre las fibras y las células, es amorfo y tiene un alto contenido en agua. Se encuentra compuesto por proteoglicanos, ácido hialurónico y sulfato de condroitina. La fibronectina une a los fibroblastos a las fibras y los componentes de la sustancia intercelular. Los tres tipos de fibras de tejido conectivo son: fibras de colágena, fibras elásticas y fibras reticulares. Dentro de los elementos celulares, la principal célula presente son los fibroblastos de igual forma existen mastocitos, macrófagos, adipocitos y eosinófilos. Las características clínicas de la encía en un estado de salud son: coloración rosa coral o pálido, el contorno corresponde con la anatomía de las coronas del órgano dentario, la consistencia es firme y resilente, debe presentar una textura similar a una cascara de naranja. Cualquier alteración en lo antes mencionado, denotará un estado patológico o gingivitis.

LIGAMENTO PERIODONTAL

El ligamento periodontal, es el tejido conectivo que rodea la superficie de la raíz anatómica y el cual lo conecta con el hueso alveolar. Es continuo con el tejido conectivo de la encía y lo comunica con los espacios endosteales del hueso alveolar. Los elementos más importantes del ligamento periodontal son las fibras, las cuales son de colágena y están dispuestas en bulto y presentan una forma de olas cuando son observadas en cortes

longitudinales. La proteína colágena es el principal componente del ligamento periodontal, esta proteína es bio-sintetizada por los fibroblastos presentes en este tejido y en su mayoría está compuesto por colágena tipo I y III, sin embargo, la colágena tipo IV está presente en la lámina basal. Las principales fibras del ligamento periodontal se encuentran dispuesta en cuatro grupos, que son: fibras transeptales, fibras de la cresta, fibras horizontales, fibras oblicuas, fibras apicales y fibras interradiculares. Dentro de los elementos celulares encontramos a los fibroblastos, cementoblastos y osteoblastos. Las funciones del ligamento periodontal son: nutrición, sensitivas, absorber las fuerzas de la masticación, mantener al órgano dentario dentro del alveolo, y de remodelación.

CEMENTO RADICULAR

El cemento radicular es un tejido conectivo mineralizado, de origen mesenquimal, el cual cubre la superficie de la raíz anatómica del órgano dentario. Existen dos tipos de cemento radicular; el cemento acelular (primario) y el cemento celular (secundario). Ambos tipos consisten de una matriz interfibrilar mineralizada y fibras de colágena. El cemento es un tejido que se deposita durante toda la vida, lo cual sucede en la zona apical de la raíz del órgano dentario. Asimismo, el cemento radicular, presenta muy frecuentemente reabsorción, sin embargo, éste tejido presenta un grado de reparación bajo y va a depender de la viabilidad del tejido conectivo. Los cementoblastos, son las células que se encargan de sintetizar este tejido, y aunque se creía que era un tipo de tejido óseo, se ha demostrado que presenta características propias, lo cual lo hace un tejido único.

HUESO ALVEOLAR

El hueso alveolar es la porción del maxilar y de la mandíbula que forma y soporta al órgano dentario (alveolo). El hueso alveolar anatómicamente se clasifica en tres regiones: hueso cortical, pared interna de hueso compacto (compuesto por hueso compacto) y hueso trabeculado. Los osteoblastos, son las células encargadas de sintetizar la matriz

extracelular, aunque también existen otro tipo de células como son: osteocitos y osteoclastos; los osteocitos son células que se encuentran dentro de la matriz mineralizada de hueso, y los osteoclastos que se encargan de reabsorber el tejido óseo en situación de estrés.

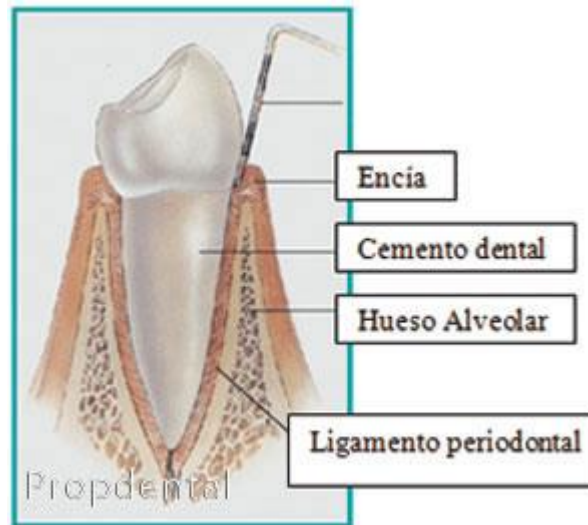


Figura 1. Se observa los componentes del Periodonto Dental

GINGIVITIS

La gingivitis es un proceso inflamatorio de la encía que puede ser reversible, caracterizado por el cambio de coloración, pérdida de la forma y agrandamiento de la encía. A pesar de estos cambios, la unión de la encía y el órgano dentario permanece intacto y por lo tanto no hay pérdida de los tejidos de soporte. El tratamiento de esta enfermedad es la remoción del cálculo, que es el causante de ésta [1].

PERIODONTITIS

La periodontitis es definida como la inflamación de los tejidos de soporte del órgano dentario causado por la acumulación de microorganismos, resultando en la destrucción progresiva del ligamento periodontal, hueso alveolar, cemento y encía con la subsecuente formación de bolsa periodontal, recesión gingival o ambas. La característica clínica más evidente es la pérdida de inserción. Esto es generalmente acompañado con la formación de la bolsa periodontal y cambios en la densidad ósea del alveolo [2, 3]. Esta enfermedad se puede clasificar en:

Periodontitis crónica

La periodontitis crónica es la forma más común de periodontitis, y las características más notables son: acumulación de cálculo subgingival, destrucción de tejidos asociado con factores locales, rango de progresión bajo, puede ser modificada por factores sistémicos como la diabetes mellitus y el VIH, puede estar presente en niños. La enfermedad también puede ser descrita según el grado de severidad como leve, moderada o severa basado en la cantidad de la pérdida de inserción[3, 4].

Periodontitis agresiva

La periodontitis agresiva difiere de la crónica principalmente en la rápida progresión de la enfermedad, así como en la ausencia de grandes acumulaciones de placa dentobacteriana y cálculo; generalmente existe un antecedente genético asociado a esta enfermedad[3, 4].

ESTRATEGIAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA PERIODONTITIS

Dentro de las estrategias conservadoras para tratar de revertir los efectos indeseables de la enfermedad periodontal, la mayoría son terapias quirúrgicas dentro de las cuales se encuentran: raspado y alisado, gingivectomía, curetaje abierto o cerrado. La terapia periodontal tradicional trae como resultado la disminución de la longitud de la bolsa periodontal, que trae como consecuencia recesión de los tejidos periodontales, trayendo como resultado la exposición de la superficie radicular del órgano dentario. Como resultado final podemos encontrar la pérdida y recesión de los tejidos gingivales, así como, el dolor e incomodidad del paciente a dichos procedimientos [5, 6].

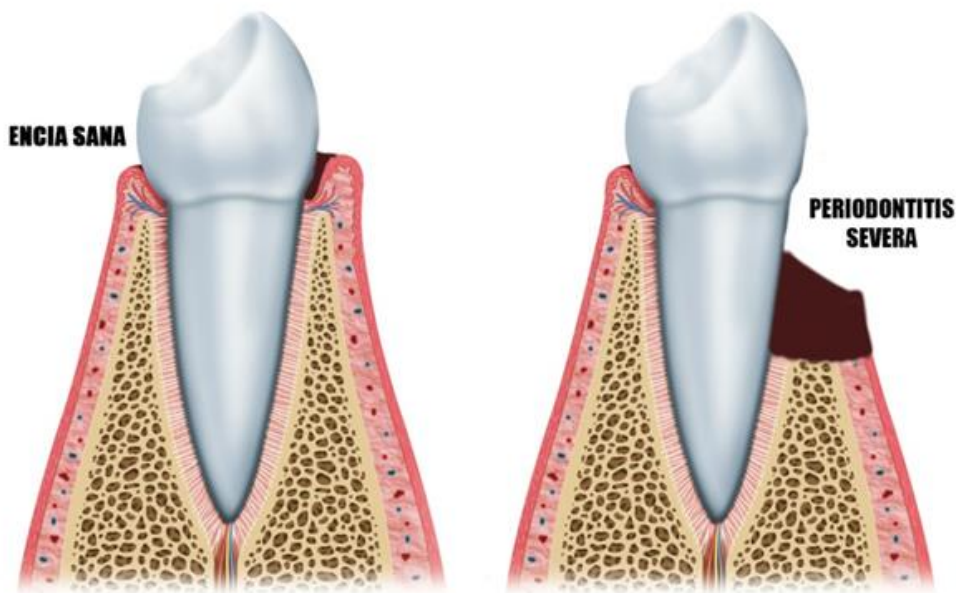


Figura 2. Esquema que muestra la conformación es estado de salud del periodonto, en el cual se puede apreciar la integridad de la encía, hueso alveolar, cemento radicular y ligamento periodontal (izquierda). Esquema que muestra la periodontitis severa, en la cual tanto la encía, hueso alveolar, cemento radicular y ligamento periodontal, se ven severamente comprometidos, esto a causa de la acumulación de placa dentobacteriana,

aunado a otros factores como son mala higiene bucodental, factores hereditarios, tabaquismo (derecha).

NUEVAS ESTRATEGIAS

En años recientes, se han venido desarrollando nuevas estrategias para tratar de regenerar los tejidos perdidos por la enfermedad periodontal como son: injerto de tejido suave, injertos de tejidos óseo, biomodificaciones de la superficie del órgano dentario, regeneración guiada de tejido óseo, terapia con factores de crecimiento y terapia génica. Así mismo, varios tipos de materiales han sido utilizados en el tratamiento.

Un injerto ideal debe ser biocompatible, seguro, hipoalergénico, no tóxico y no debe presentar riesgo de diseminar enfermedades. Tiene que ser lo suficientemente fuerte para resistir las fuerzas mecánicas y debe poseer un rango de absorción adecuado[7].

INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos es una disciplina relativamente nueva y con un crecimiento exponencial, ya que tiene como principal objetivo regenerar los tejidos que conforman los órganos del cuerpo humano que han sido dañados, ya sea, por trauma o enfermedad y en estos tiempos donde la tendencia mundial es aumentar la calidad y expectativa de vida de las personas cobra importancia[8, 9].

Para poder regenerar un tejido, entran en juego una serie de factores fundamentales, los cuales tienen que estar actuando en sinergia para poder lograr el objetivo, que es devolver la forma y función del órgano en cuestión.

Los tres factores importantes son:

- 1) Células y sus fuentes
- 2) El diseño del Andamio
- 3) Los factores o inductores específicos

Por ello, se mencionarán brevemente los tres pilares de las nuevas estrategias en la ingeniería de tejidos:

1) CÉLULAS

Dentro de estos tres factores el primero de ellos se encuentran con cuales células se deben trabajar, se proponen que los mejores resultados son las propias células, dentro de este apartado existen gran cantidad, sin embargo, las más prometedoras son las células troncales mesenquimales (MSC) ya que éstas, presentan una gran capacidad de proliferación, así como propiedades de inmunoregulación[13], que es importante a la hora de pensar en un rechazo que podrían presentar células ya comprometidas con un fenotipo determinado, finalmente dentro de las características a destacar de estas células, es que pueden ser inducidas a cualquier tipo de linaje celular, esto es una ventaja ya que dependiendo el tipo de tejido que se esté buscando regenerar es el tipo de inducción que se le deberá proporcionar. Asimismo, el órgano dentario es un reservorio de una amplia gama de células MSC como por ejemplo las de pulpa dental, envía y ligamento periodontal [14-16].

CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

El término célula troncal mesenquimal (MSC) proviene del inglés “Stem Cell” que fue utilizado por primera vez en la década de los 90’s por Haynesworth. Las MSC se definen como células adherentes inmaduras no diferenciadas, con una alta capacidad de auto-renovación, con una morfología tipo fibroblástica y que puede diferenciarse en otros tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo. Asimismo, debe expresar los antígenos de superficie estandarizados por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), los cuales son: Más de un 95% de la población celular debe expresar positividad para los antígenos CD73, CD90 y CD105. Deben ser negativos para CD34

(marcador de célula endotelial), CD45 (leucocitario), CD14 y CD11 (marcadores de macrófagos y monocitos).

FUENTES DE OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS TRONCALES

Las principales fuentes de obtención para el aislamiento de las células troncales son: el tejido adiposo, médula ósea, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, tejido neural, hueso trabecular, sangre de cordón umbilical, tejido pulmonar, pulpa dental y ligamento periodontal.

FIBROBLASTOS DE LA PULPA

Los fibroblastos son las células más numerosas en la pulpa. Parecen ser células de tejido específico, capaz de dar lugar a células comisionadas por establecer la diferenciación (p. ej., células similares a los odontoblastos). Estas células sintetizan colágeno tipo I y III, así como proteoglucanos y glucosaminoglucanos. Sin embargo, actualmente, se considera que a partir del tejido pulpar se obtienen fibroblastos de pulpa indiferenciados. Los cuales al ser caracterizados por los marcadores CD73, CD90 y CD105 presentan un potencial alto de células MSC, siendo una fuente valiosa en los estudios en ingeniería de tejidos dentales actualmente.

2) EL DISEÑO DEL ANDAMIO

En segundo lugar, es el diseño y fabricación de andamios que simulen las propiedades tanto físicas, químicas y mecánicas de la matriz extracelular nativa, en donde se encuentran sostenidas las células propias de cada órgano [10-12]. La técnica de síntesis de películas delgadas poliméricas (PDP) emerge como una alternativa altamente eficaz para

desarrollar membranas tanto en escalas micrométricas y nanométricas, los cuales presentan diferentes tipos de propiedades fisicoquímicas, dependiendo del polímero que se utilice para su preparación[20-22]. Es un método físico ya que depende de la evaporación del solvente donde se disuelve el polímero que se vacía sobre superficies de vidrio o teflón. El grosor depende de la velocidad de evaporación del solvente y de la temperatura que puede ser a cuarto ambiental o hasta los 80°C.

En nuestro caso utilizamos para el desarrollo de la membrana un biopolímero como el ácido poliláctico (PLA). Este biopolímero permite la obtención de productos reabsorbibles y biodegradables. Ha sido aprobado por la Food and Drug Administración (FDA) para usos médicos ya que de su biodegradación se obtiene en el cuerpo agua, dióxido de carbono y material orgánico. Asimismo, se puede formular para ser tanto rígido como flexible y por tal motivo ha encontrado múltiples aplicaciones en cirugía, ortopedia, ortodoncia, oftalmología, traumatología y otras ramas de la medicina y como soporte para el suministro controlado de numerosos medicamentos.

3) LOS FACTORES O INDUCTORES ESPECÍFICOS

En tercer lugar, tenemos a las señales moleculares, donde principalmente se encuentran biocerámicos (apatitas, carbonatos de calcio) y factores de crecimiento y diferenciación que inducen funciones específicas a las células MSC o adultas del tejido [7, 10, 14, 17]. Las biocerámicas son una fuente biocompatibilidad con los tejidos y no inducen inflamación o una respuesta de cuerpo extraño. Estos materiales pueden ser considerados como osteoconductivos, osteoinductivos u osteregulativos. Lo que significa que pueden inducir la formación de hueso, conducir la forma del crecimiento del hueso y regular las funciones del hueso al oseo-integrarse con el tejido circundante.

En nuestro estudio utilizamos el carbonato de calcio (CaCO₃) por ser una biocerámica que esta ubicada en las sales de calcio la cual posee una superficie reactiva, densos y porosas cuya unión al hueso se lleva a cabo mediante enlaces químicos, formando una fijación

bioactiva. Sus formas reabsorbibles se han empleado como vehículos de liberación de sustancias. Su capacidad de dar lugar a la formación de una capa de apatita hidroxicarbonatada activa idéntica a la fase mineral del hueso, los hace muy útiles en cuanto a su aplicación en la superficie de implantes óseos para facilitar su osteointegración. Asimismo, una biocerámica muy utilizada son las sales derivadas de corales o de la cascara de huevo, lo cual trae consigo una biodisponibilidad como fuente natural que actualmente está comenzando a ser empleada en odontología y en medicina para la regeneración de tejidos óseos. Debido a esto la biocerámica de CaCO₃ posee una alta biocompatibilidad y bioactividad con las células humanas. Provee de sitios activos para la biomineralización, proliferación, adhesión y además posee propiedades de osteoconducción y osteointegración. Sin embargo, su fragilidad y baja resistencia a la compresión limitan su uso clínico en injertos que deben soportar cargas o como material de relleno. Otra de sus características es su rápida cinética de biodegradación, registrándose en estudios hasta 3 meses su reabsorción post-implantación (19-21).

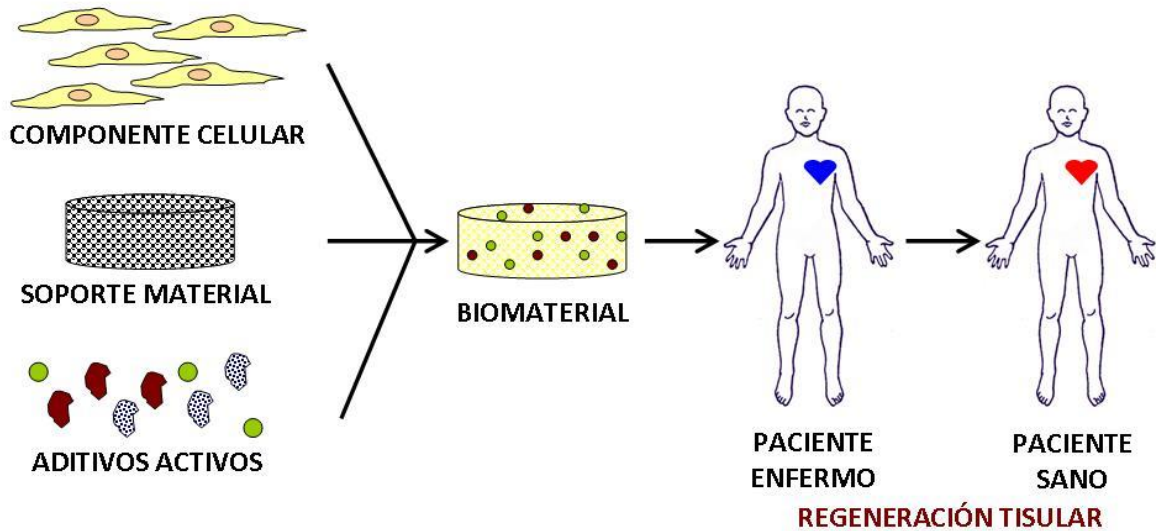
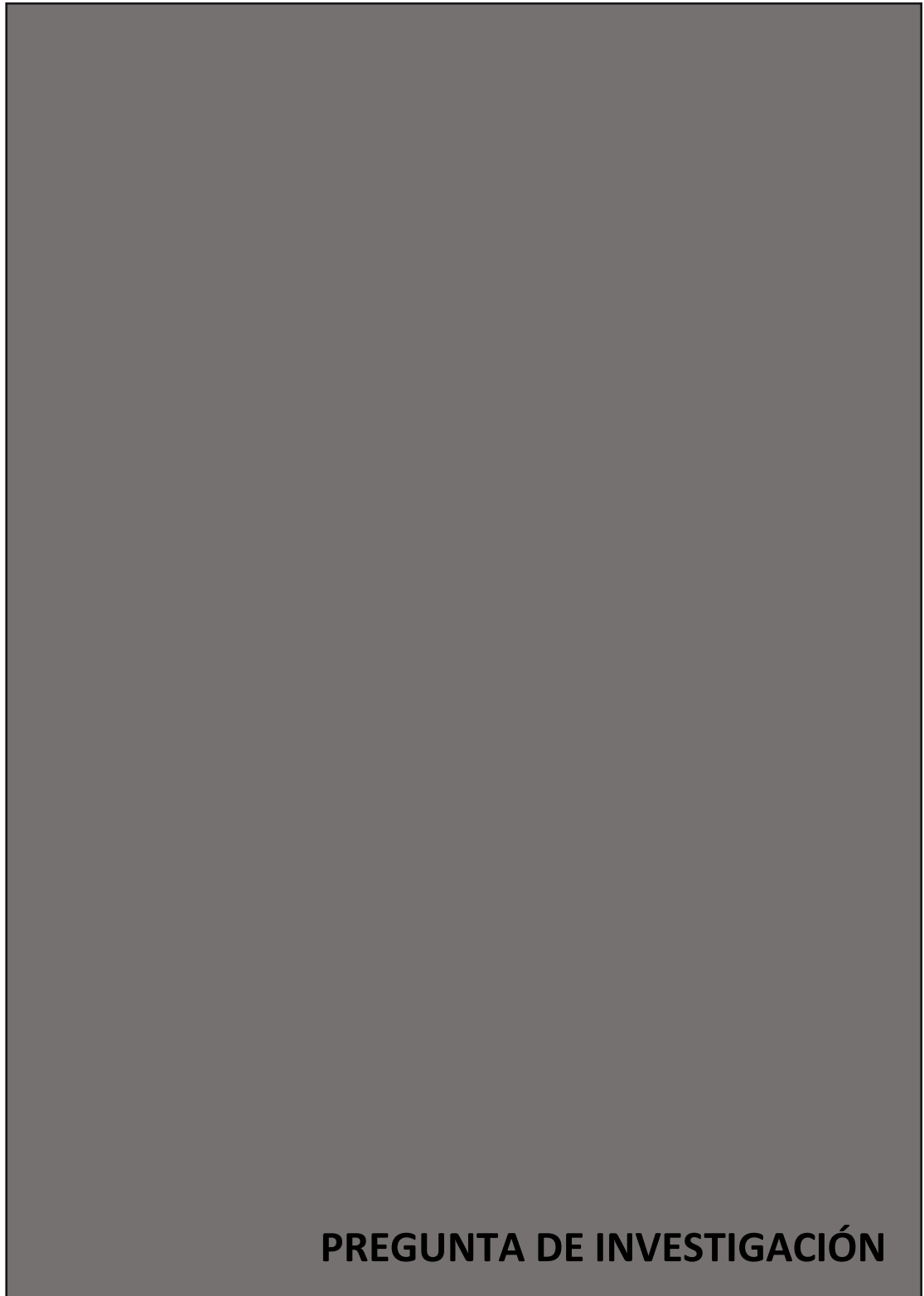


Figura 3. Esquema de la interacción de andamios, células y señales moleculares, para hacer posible la regeneración de tejidos y órganos.

JUSTIFICACIÓN

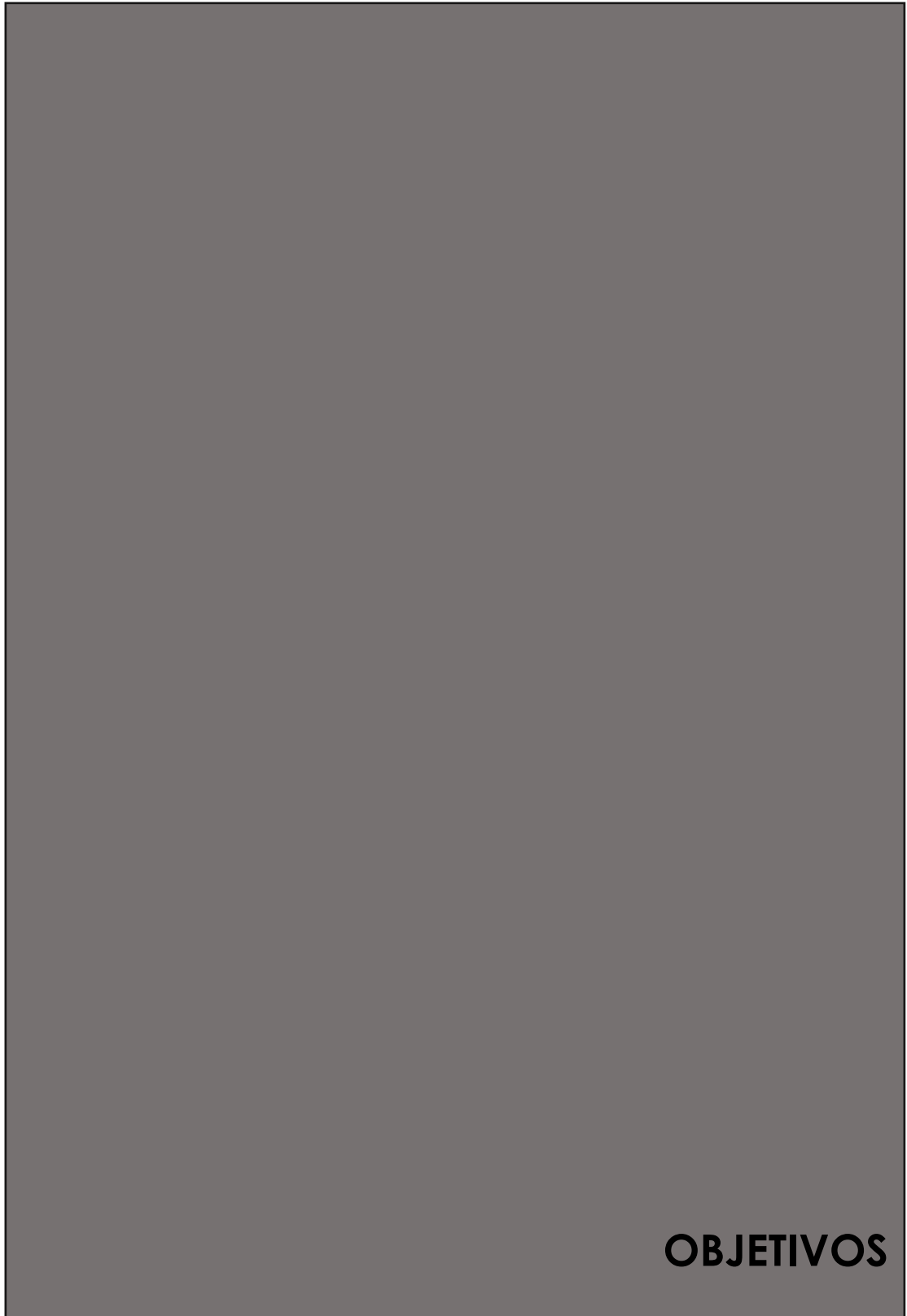
El uso de barreras que puedan soportar y guiar el proceso de regeneración para restaurar la morfología, fisiología, estética y confort de los tejidos periodontales afectados por la enfermedad periodontal justifican y hacen necesario la investigación de nuevas estrategias para el desarrollo de películas delgadas biocomposite con futuras miras a su aplicación como membranas periodontales. Los avances en los campos de la ingeniería tisular han permitido el desarrollo de plataformas que actúan como un sustituto artificial de la matriz extracelular, que recapitulan las funciones básicas de ésta última, proporcionando soporte, forma y estructuras superficiales con características topográficas y estructurales a nivel celular, que promueven la adhesión, migración y diferenciación celular específica para la regeneración tisular que regulen la respuesta biológica local. Así este estudio pretende contribuir al desarrollado de membranas por la técnica de películas delgadas poliméricas. Por ello, proponemos combinar el PLA debido a las propiedades de biocompatibilidad y capacidad de biodegradación y; en segundo lugar, a la biocerámica de CaCO₃, que puede conservar la integridad estructural, dimensional y mecánica lo suficiente para permitir una respuesta celular que conlleve a la regeneración tisular.

Como cirujano dentista es importante saber alternativas de tratamiento para cada una de las especialidades y hablando de la enfermedad periodontal no es la excepción, pues se trata de una enfermedad multifactorial que causa la pérdida de los tejidos de sostén del diente; cuyos tratamientos se limitan a la detención del progreso de la enfermedad y otros tratamientos que están enfocados en la reparación celular pero que tienen algunas limitantes, pues no cumplen con la estimulación de proliferación y diferenciación de las células encargadas de reparar los tejidos de soporte del diente. Significa esto que es difícil recuperar totalmente la funcionalidad de los tejidos.



PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existirá una respuesta biológica aumentada –adhesión, proliferación– de las células derivadas de pulpa dental ante la exposición a una película delgada composite de PLA/CaCO₃, en comparación con las de PLA?



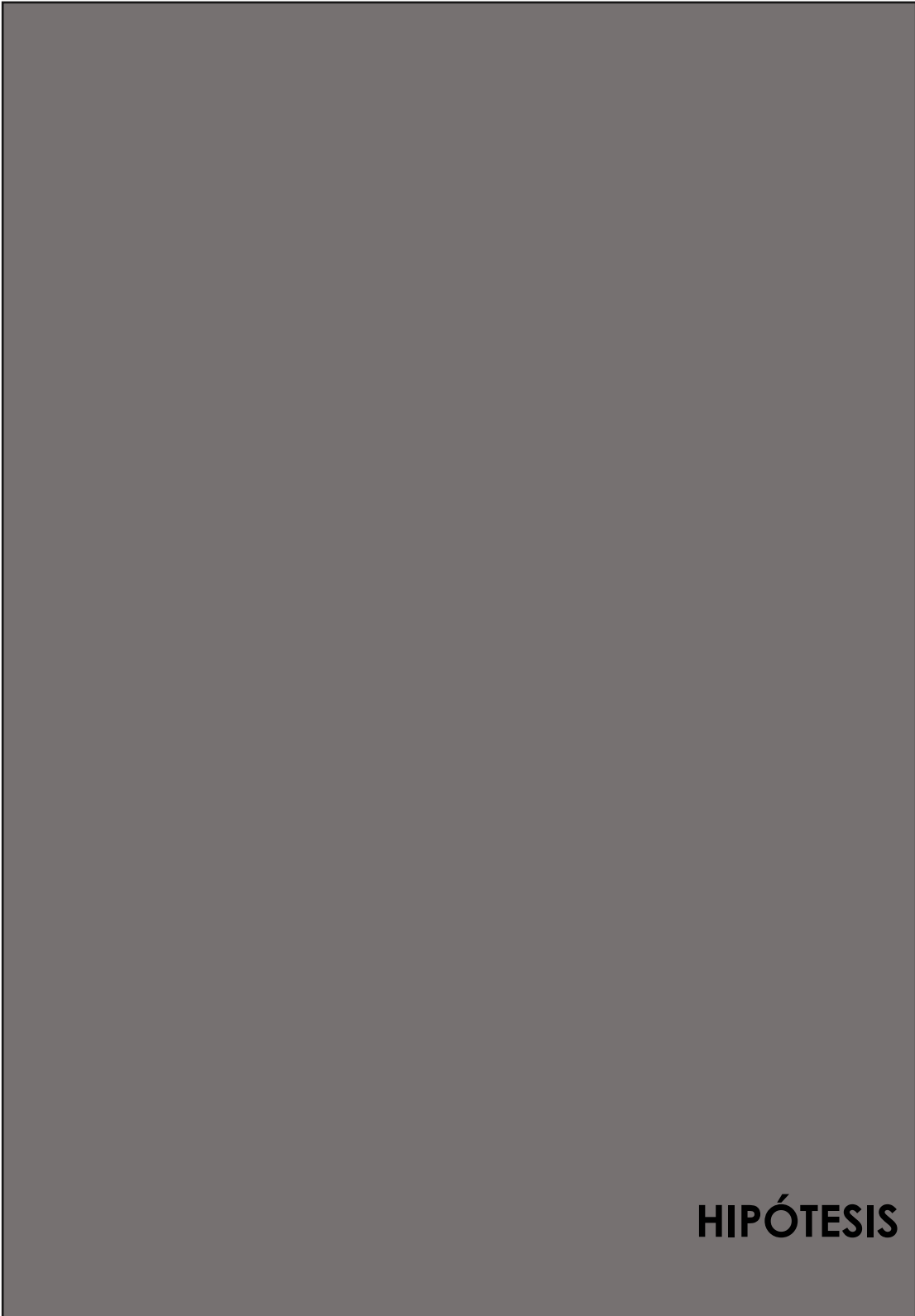
OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta de biocompatibilidad de células derivadas de pulpa dental cultivados sobre películas delgadas composites de PLA/CaCO₃.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Sintetizar las películas delgadas de PLA y composites de PLA/CaCO₃.
- 2) Aislar las células a partir de tejido pulpar.
- 3) Evaluar la respuesta de viabilidad celular de células derivadas de pulpa dental cultivadas sobre las películas delgadas de PLA y composite de PLA/CaCO₃.

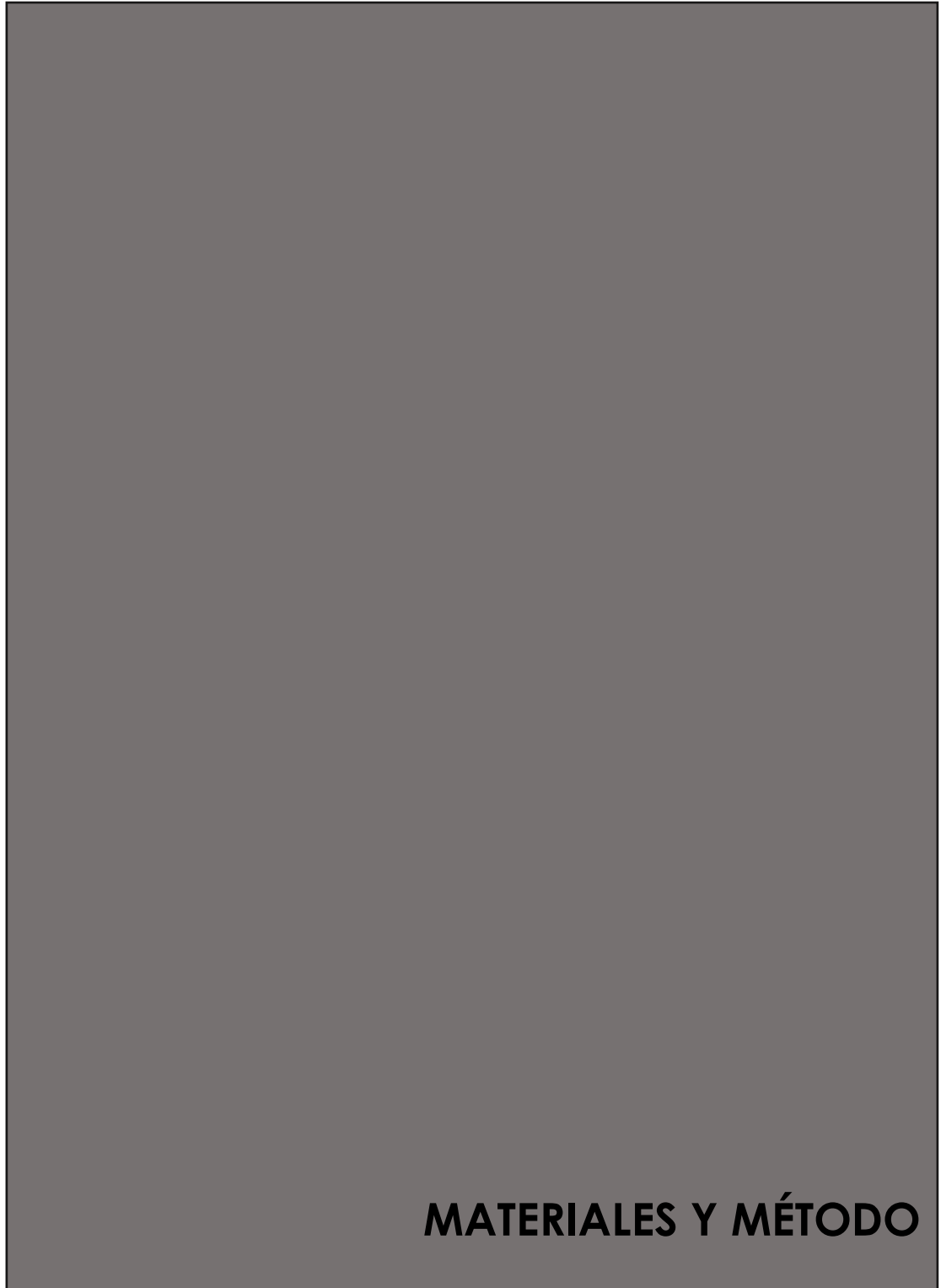
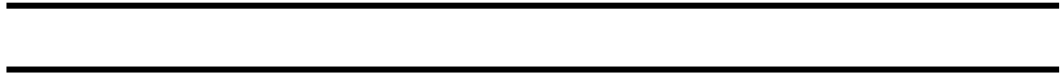


HIPÓTESIS

Las películas delgadas composites de PLA/CaCO₃ aumentaran la respuesta de biocompatibilidad de las células derivadas de pulpa dental

HIPÓTESIS NULA

Las películas delgadas composites de PLA/CaCO₃ no aumentaran la respuesta de biocompatibilidad de las células derivadas de pulpa dental.



MATERIALES Y MÉTODO

1. Síntesis de la película delgada de PLA/CaCO₃

El ácido poliláctico (PLA) con un peso molecular de 192,000 se obtuvo de la empresa SIGMA, Aldrich, USA. Para la síntesis de las películas delgadas se pesaron 10 g de PLA y se disolvieron en 100 mL de una solución de cloroformo/etanol agitándose 24 h. Posteriormente, la solución de PLA se decantó en moldes de teflón circulares de 20 cm para desarrollar las películas delgadas, dejándose incubar en un horno a 60°C por 48 h.

Para la síntesis y desarrollo de las películas delgadas composites de PLA/CaCO₃ se siguió el mismo procedimiento para la construcción de la película de PLA, sin embargo, la biocerámica CaCO₃ se adicionó a un peso de 0.5 g, dejándose en agitación durante toda la noche. Una vez obtenida la mezcla, se decantó en moldes de teflón circulares de 20 cm para desarrollar las películas delgadas composites, dejándose incubar en un horno a 60°C por 48 h.

2. Selección de pacientes

Para realizar este estudio, se reclutaron 3 pacientes sanos de ambos sexos, adolescentes en un intervalo de 12 a 18 años de edad que acudían a la Clínica de Ortodoncia de la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. Su tratamiento de base contempló extracciones de primeros premolares superiores e inferiores y ellos fueron informados del estudio para su consentimiento y donación de los órganos dentarios. Con los criterios que a continuación se describen.

Los criterios de Inclusión fueron: pacientes sin alteraciones sistémicas, buena salud periodontal, dientes primeros y segundos premolares, tanto maxilares como mandibulares, izquierdos y derechos.

Los criterios de exclusión fueron: pacientes con enfermedades sistémicas, pacientes con gingivitis y/o enfermedad periodontal, premolares con presencia de cálculo dental y/o presencia de caries y/o con reacción periapical.

3. Extracción dental

La extracción de los premolares de los pacientes se llevó a cabo en la Clínica de Cirugía Oral y Maxilofacial de la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. La extracción se realizó utilizando 1.8 mililitros de anestésico lidocaína con epinefrina (36 mg/0.025mg, Uniseal). Después el proceso de debridación con una legra de Molt y posteriormente se luxó el órgano dentario con un elevador recto delgado. Terminada la luxación se extrajo propiamente el diente con fórceps No. 150. El órgano dentario extraído se colocó inmediatamente en medio Dulbelcos Modified Eagle Medium (DMEM) frío para garantizar el estado celular del tejido pulpar.

4. Obtención de tejido pulpar

Posterior a la extracción del órgano dentario, se procedió a obtener las pulpas dentales. El órgano dentario se fracturó por medio de la pieza de alta velocidad para garantizar no dañar el tejido pulpar. La muestra pulpar se extrajo de la cavidad y se colocó en medio alpha-MEM frío estéril.

5. Aislamiento de las Células de Pulpa Dental

Para llevar el aislamiento de las células derivadas de la pulpa dental; los tejidos pulpares se colocaron en una solución de 3 mg/mL de colagenasa tipo I durante 10 minutos. Pasado el tiempo de digestión se lavaron con medio alpha-MEM con suero fetal bovino (SFB) al 10% por 3 minutos. Los extractos digeridos de las pulpas dentales se dejaron crecer en cajas de cultivo de 6 pozos en presencia del medio de cultivo alpha-MEM suplementado con 10% de SFB, una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/mL), estreptomina (100 µ/mL) y fungisona (0.3 µ /mL), 100 mM de aminoácidos no esenciales y 100 mM de piruvato de sodio, hasta obtener colonias celulares, aproximadamente de 2 a 5 semanas de cultivo. El

medio de cultivo antes mencionado se cambió cada tercer día, para garantizar el crecimiento celular.

6. Procesamiento de las películas delgadas para cultivo celular

Previo al cultivo celular; las películas delgadas de PLA y composites de PLA/CaCO₃ fueron cortadas en discos de 8 mm de diámetro.

Para garantizar la esterilidad los discos de 8 mm de diámetro fueron colocados en placas de cultivo de 48 pozos y se sometieron a esterilización con una solución de etanol al 75% con antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100 µg/ml) y fungisona (0.3 µg/ml) por 30 minutos. Pasado el tiempo se retiró la solución y se dejaron secando bajo luz UV y un flujo laminar estéril de aire por 24 h.

7. Ensayo de Adhesión Celular

Para establecer el efecto de las películas delgadas de PLA y composites de PLA/CaCO₃ sobre la adhesión celular; las células derivadas de la pulpa dental se sembraron en los discos de 8 mm de diámetro a una densidad celular de 1×10^5 células/ml con 500 µL de medio alpha-MEM y se cultivarán durante 4 y 24 horas 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.

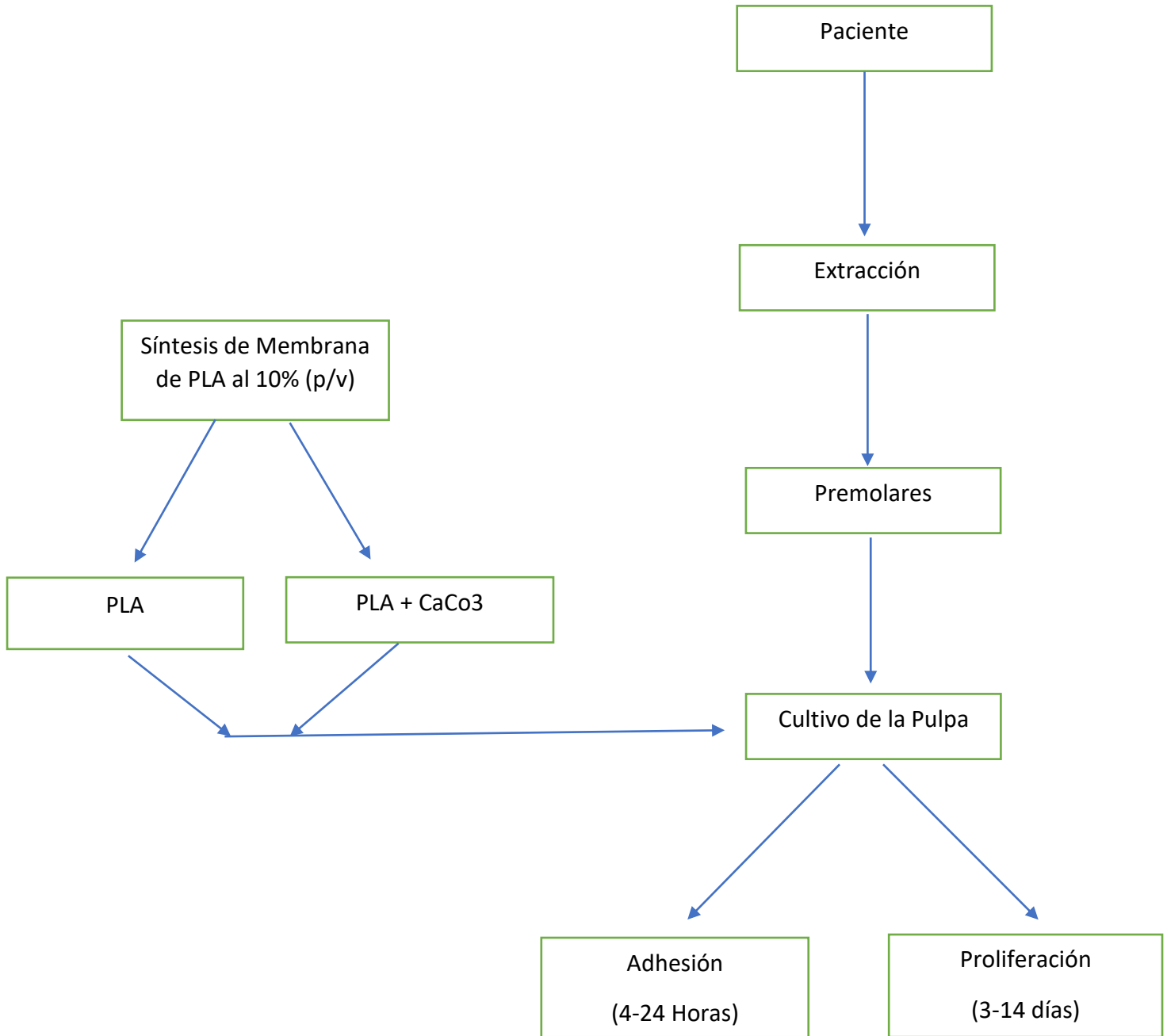
Posterior al tiempo de sembrado (4 y 24 h); las células que no se adhirieron a las superficies fueron removidas por medio de tres lavados con PBS (solución amortiguadora de fosfatos). Las células adheridas a los andamios fueron fijadas con 4% de paraformaldehído (PFA). La adherencia celular fue evaluada de acuerdo al método de Cristal Violeta; las células fijadas fueron incubadas con 0.1% de cristal violeta por 10 minutos, lavadas 3 veces con agua bidestilada para remover el colorante no específico y posteriormente el colorante fue extraído con 500µL de duodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%. De la solución obtenida se tomaron 100µL que se colocaron en un pozo de una placa

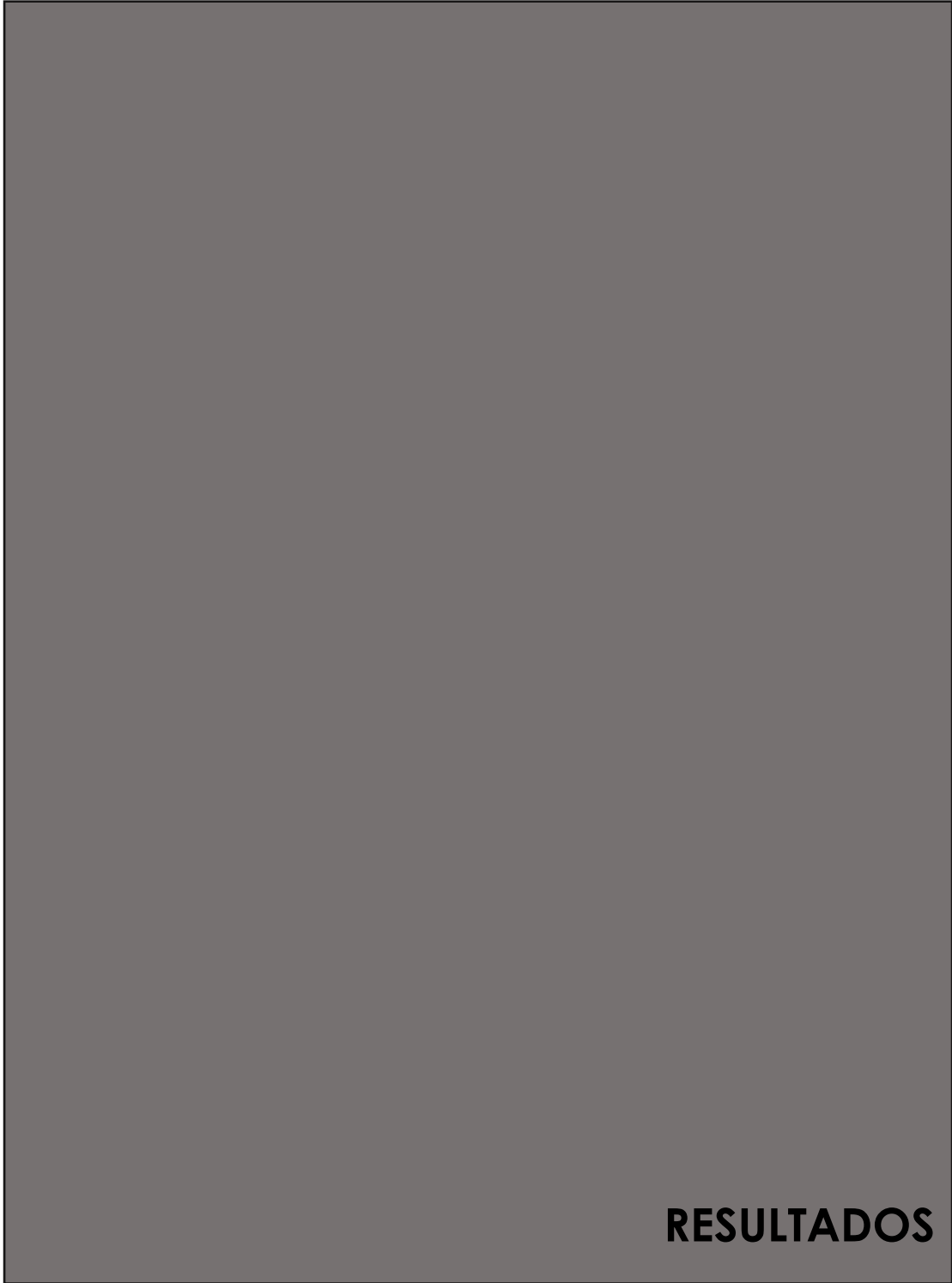
de 96 pozos para ensayos de ELISA y fue leído en un lector de placas (ChroMate, AWARENESS) a una absorbancia de 545 nm. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre los mismos platos de plástico. Los valores de la absorbancia obtenidos fueron extrapolados para determinar el porcentaje de células adheridas a las películas delgadas. Los experimentos de adhesión celular se realizaron por triplicado, repitiéndose por lo menos tres veces.

8. Ensayo de Viabilidad Celular (Citotoxicidad)

La viabilidad celular de las películas delgadas de PLA y composites de PLA/CaCO₃ al sembrar las células derivadas de la pulpa dental se llevó a cabo por el ensayo CCK-8 (DOJINDO); este método se basa en la reducción de una sal de tetrazolio por medio de la enzima deshidrogenasa dejando un producto naranja en el medio de cultivo. Para ello; las células fueron sembradas a una densidad celular de 1×10^5 células/mL sobre las películas delgadas de 8 mm de diámetro en medio alpha-MEM 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 por triplicado por 3, 5, 7 y 14 días de cultivo. Después de cada período experimental, las células fueron incubadas con 10 µL de la solución del CCK-8 a 37°C por 4 horas. Pasado este tiempo, se tomaron 200µL que se colocaron en pozos de una placa de 96 pozos para ensayos de ELISA, se llevó a un lector de placas para obtener la densidad óptica a una longitud de onda de 450 nm. Debido a que la generación del producto anaranjado es (directamente) proporcional a la actividad oxidativa de la enzima deshidrogenasa, una disminución en los valores que se obtengan en la absorbancia indicaría una medida de la viabilidad celular. Los experimentos se realizaron por triplicado repitiéndose tres veces.

DIAGRAMA DE FLUJO DEL TRABAJO DE TESIS





RESULTADOS

A los pacientes se les realizaron las extracciones de los primeros premolares superiores e inferiores para fines de este experimento realizándose en la clínica de Cirugía Maxilofacial de la DEPEI de la Facultad de Odontología, UNAM. Los dientes una vez extraídos inmediatamente se colocaron en medio DMEM con antibióticos para garantizar la preservación de los tejidos involucrados en este estudio.

Como se muestra en la figura 4, al órgano dentario primero se limpió los restos de sangre, encía y ligamento para poder proceder a un corte en la corona del diente por medio de un rotor con disco de diamante, para exponer el tejido pulpar para su extracción. La pulpa al ser extraída se colocó en platos de cultivo con medio rico en antibióticos para lavar el tejido y evitar contaminaciones por la manipulación, para posteriormente proceder a realizar el cultivo celular conocido como técnica de explante, donde el tejido se somete a crecimiento donde después de un periodo de tiempo empezaran a migrar los fibroblastos pulpares indiferenciados o células troncales mesenquimales.

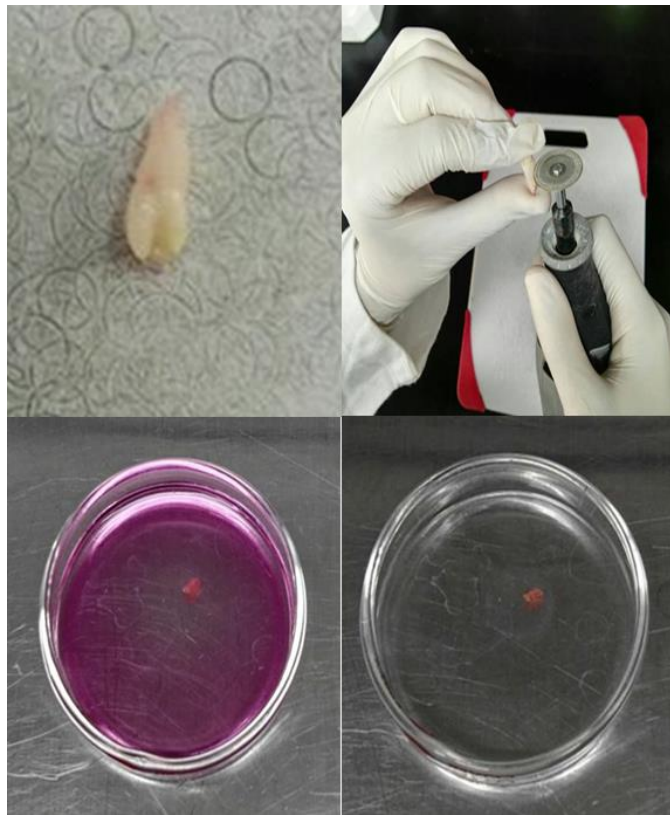


Figura 4. Extracción del tejido pulpar

Una vez extraída la pulpa, se colocó dentro de una caja de Petri con medio para su máxima conservación. Una semana después de haber realizado este proceso, por medio del microscopio se logra observar la migración de las células indiferenciadas que en nuestro caso manejaremos como fibroblastos derivados de pulpa (Figura 5). El tejido pulpar se mantiene hasta obtener una densidad celular en el plato de cultivo para realizar el retiro del tejido y quedarse solo con el cultivo celular como se observa en la figura 6. Aproximadamente se logra después de 4 semanas y media de mantener en cultivo el tejido. La morfología que se observa es del tipo fibroblastoide.

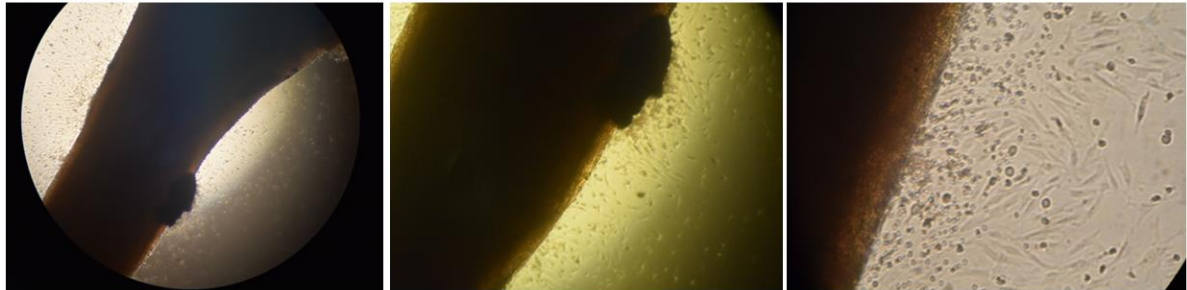


Figura 5. Microscopía óptica del tejido pulpar donde se observa la migración de los fibroblastos derivados de pulpa (FDP) a lo largo del tejido.

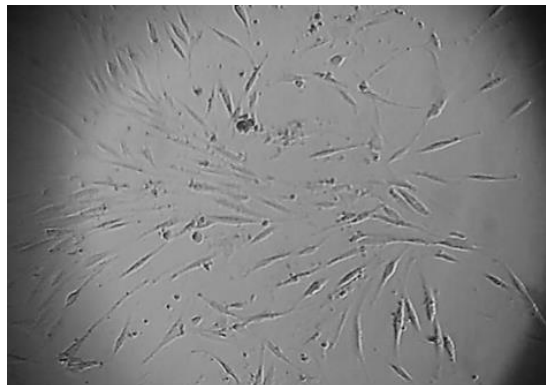


Figura 6. Cultivo celular de los fibroblastos de pulpa (FPD)

En las gráficas se puede apreciar la respuesta de adhesión y proliferación celular por parte de los fibroblastos derivados de pulpa dental (FDP). Se observa que los FDP tienen una mayor adhesión y proliferación en las membranas de PLA con presencia de la biocerámica de carbonato de calcio (PLA/CaCO₃) cuando se compara con la membrana de PLA. Asimismo, el ensayo de adhesión se realizó por el método de cristal violeta, lo cual nos permitió poder obtener imágenes de la morfología de los FDP al estar interactuando con la superficie de la membrana compuesta de PLA. Estas imágenes sustentan la respuesta de adhesión y de proliferación donde se observa un aumento en las interacciones célula FDP y PLA/CaCO₃.

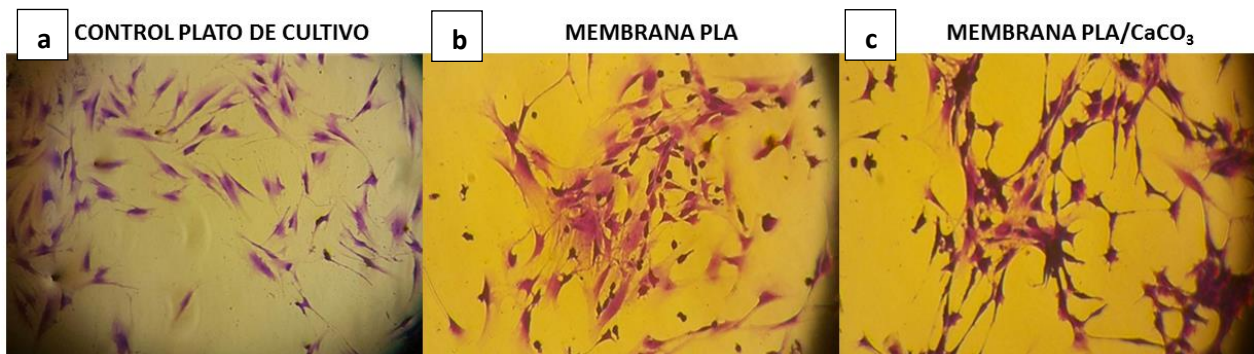
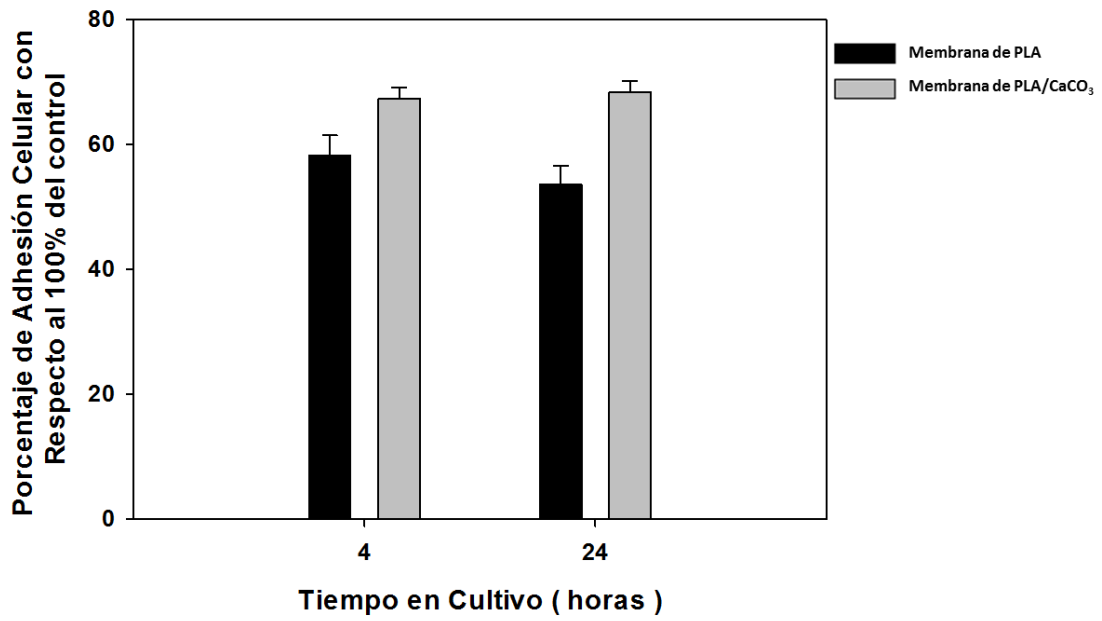
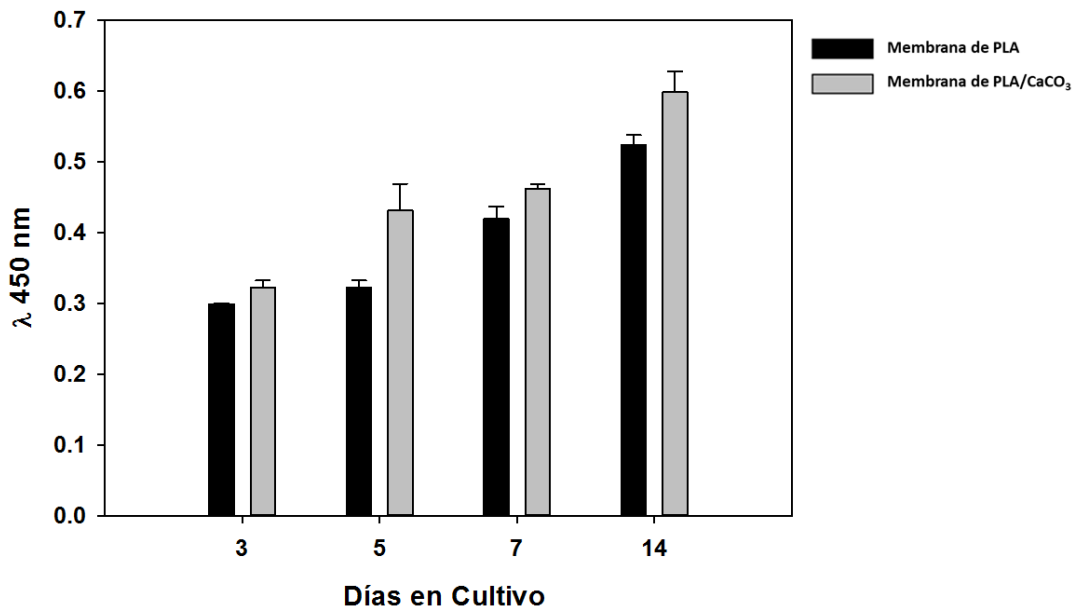


Figura 7. Adhesión de fibroblastos de pulpa al plato de cultivo (a), membrana de PLA (b) y membrana de PLA/CaCO₃ (c) teñidos con cristal violeta.



Grafica 1. Adhesión de los fibroblastos de pulpa en las membranas de PLA y PLA/CaCO₃.



Grafica 2. Respuesta de proliferación celular de los FPD en las membranas de PLA y PLA/CaCO₃.

DISCUSIÓN

En la búsqueda de alternativas de solución para reintegrar los tejidos de soporte dañados por la enfermedad periodontal está la Regeneración Tisular Guiada. Es una técnica quirúrgica causada en Periodoncia por la cual se procede a la restauración de hueso, cemento y ligamento periodontal a sus niveles originales mediante una membrana que funciona como barrera física y pueda mantener un espacio entre el hueso, ligamento periodontal y el tejido conectivo. Esto con la finalidad de impedir la adhesión del tejido gingival a la raíz dental.

La primera membrana usada en esta cirugía fue elaborada de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE). Se trata de una membrana no absorbible que tiene una rigidez excelente, aunque con el tiempo los investigadores y clínicos se dieron cuenta de las desventajas. Entre ellas son la fácil contaminación bacteriana si se llegara a exponer a la cavidad bucal y una segunda intervención para retirarlas. Alterar de nuevo los tejidos blandos tras su cicatrización y pensando en el costo beneficio de los pacientes fueron las razones principales de llevar a los investigadores crear membranas absorbibles que cumplieran con las mismas funciones en general de una membrana como son la biocompatibilidad, evitar que tipos indeseables de células penetren, pero permitir el paso de nutrientes y gases, integración tisular, ser capaz de crear y mantener un espacio y fácil de manipular.

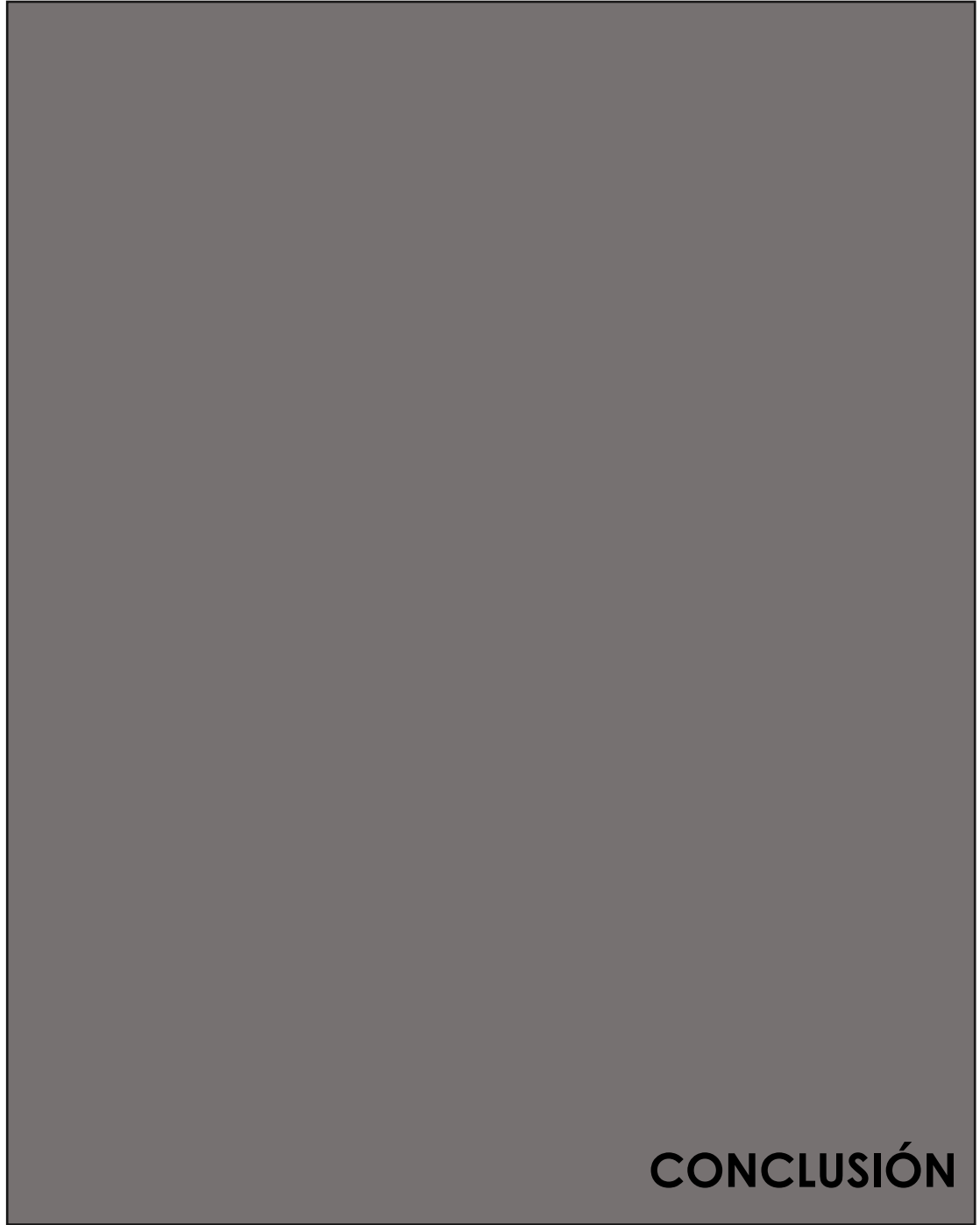
Salieron al mercado membranas de colágeno, de ácido poliláctico, ácido poliglicólico y copolímeros de estas últimas.

Existen estudios que demuestran el uso de todo tipo de material que existe de las membranas absorbibles en la cirugía periodontal mencionando método de colocación y para que se usa cada una. Para este estudio nos enfocamos en el uso del ácido poliláctico pensando en el uso aumentado en medicina de este material. Hay pocos estudios en la utilización de estas membranas en el área de periodoncia debido a su difícil manipulación y también por los riesgos de colapso porque no presentan rigidez. Los estudios que se encontraron demostraron que cuando se usaban membranas de ácido poliláctico tenían que usar micro tornillos para mayor rigidez y para su uso en la regeneración ósea guiada había que colocar injerto óseo de relleno en el defecto e impedir su colapso.

El ácido poliláctico por sí solo funciona sólo como una barrera en la Regeneración Tisular Guiada pero se comprobó en esta investigación de manera *in vitro* que agregando carbonato de calcio considerada una biocerámica con un alto potencial osteoinductor u osteoconductor hay una mayor proliferación celular de los fibroblastos derivados de pulpa dental que en ausencia de la biocerámica. Se podría pensar que también hay una mayor rigidez en la membrana porque tiene la biocerámica que puede imitar los cristales de hidroxiapatita y que también gracias a la porosidad que presenta tanto la membrana de PLA como la misma biocerámica de carbonato de calcio incrementa la respuesta celular de adhesión y de proliferación que se traduce en mayor presencia celular.

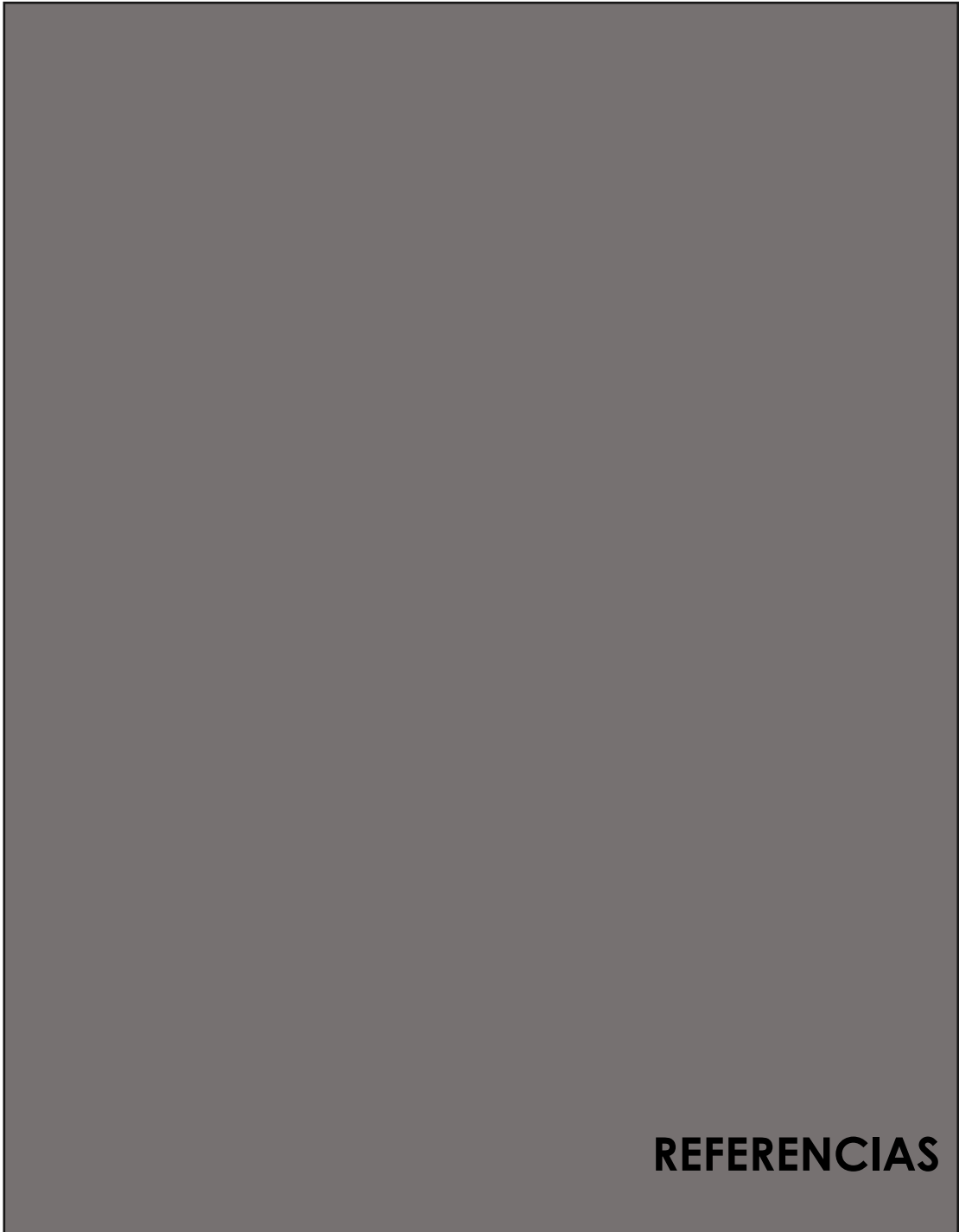
El uso de la biocerámica de carbonato de calcio para este estudio es por tratarse de un biomaterial que ha funcionado en el campo de Odontología y Ortopedia.

Asimismo, en este trabajo se utilizaron como células derivadas de la pulpa dental que corresponde a células troncales mesenquimales. Sin embargo necesitamos realizar más estudios para poder evaluar su capacidad de poder diferenciarse en otros tejidos celulares, pero en este trabajo la membrana mostro tener una buena respuesta de biocompatibilidad que esperamos en un futuro pudiera ayudar a la regeneración total de los tejidos perdidos en la enfermedad periodontal.



CONCLUSIÓN

1. La técnica de película delgada permite lograr membranas composite de biopolímeros como el ácido poli láctico (PLA) con biocerámicas activas como el carbonato de calcio (CaCO₃).
2. La membrana de PLA/CaCO₃ presenta una superficie que aumenta la respuesta de biocompatibilidad celular.
3. Con este estudio se comprobó de manera *in vitro* que en las membranas de PLA/CaCO₃ aumenta la adhesión celular y la proliferación.
4. El material es biocompatible ya que no detectamos muerte celular ni cambios en la morfología celular de los fibroblastos derivados de pulpa dental.
5. La membrana de PLA/CaCO₃ presenta un potencial uso como material para la ingeniería de tejidos en especial en el campo de la periodoncia.



REFERENCIAS

- 1) Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterials developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21: 2347-2359 (2000)
- 2) Meyer U, Joos U and Weissman HP. Biological and biophysical principles in extra corporal bone tissue engineering - Part I. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33: 325-332 (2004)
- 3) Brunski JB, Puleo DA and Nanci A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *Int J Oral Maxillofac Implants* 15: 15-46 (2000)
- 4) Wang JH, Yao CH, Chuang WY and Young TH. Development of biodegradable polyesterurethane membranes with different Surface morphologies for culture of osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 15: 761-770 (2000)
- 5) Handbook of biomaterial properties. Ed. By J. Black and G. Hasting, Chapman and Hall, (1998).
- 6) M. Vallet-Regí. Ceramics for medical applications. Perspective Article. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2, 97-108 (2001).
- 7) Faming Zhang, Jiang Chang, Jianxi Lu, Kaili Lin. Bioinspired structure of bioceramics for bone regeneration in load-bearing sites. *Acta Biomaterialia* 3: 896-904 (2007)
- 8) Rouahi M, Champion E, Hardouin P and Anselmo K. Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials. *Biomaterials* 27: 2829-2844 (2006)
- 9) Liu Y, Cooper PR, Barralet JE and Shelton MR. Influence of calcium phosphate crystal assemblies on the proliferation and osteogenic gene expression of rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 8:1393-1403 (2007)
- 10) Landis WJ. An overview of vertebrate mineralization with emphasis on collagen-mineral interaction. *Gravit Space Biol Bull* 12:15-26 (1999)
- 11) M. Vallet-Regí and J. González-Calbet. Calcium phosphates in the substitution of bone tissue. *Review Progress in Solid State Chemistry.* 32: 1-31 (2004).
- 12) Frayssinet; L. Gineste; P. Conte; J. Fages, N. Rouquet. Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement. *Biomaterials*, 19(11-12): 971-977 (1998).
- 13) H.M. KIM. Bioactive ceramics: Challenges and perspectives. *J. Ceram.*

Soc. Jpn, 109(4): S49-S57 (2001).

14) D.C. Greenspan. Bioactive ceramic implant materials. *Curr. Opin. Solid State & Mater. Science*, 4 (4): 389-393 (1999).

15) A. Rámila; S. Padilla, B. Muñoz and M. Vallet-Regí. A new hydroxyapatite/glass biphasic materials: in vitro bioactivity. *Chem. Mater.* 14: 2439-2443 (2002)

16) M. Vallet-Regí; A. Rámila; S. Padilla, B. Muñoz. Bioactive glasses as accelerators of the apatites bioactivity. *J. Biomed. Mater. Res.* 66: 580-585 (2003).

17) J.M. Bouler; R.Z. Legeros, G. Daculsi. Biphasic calcium phosphates: influence of three synthesis parameters on the HA/beta TCP ratio. *J. Biomed. Mater. Res.* 51(4): 680-684 (2000).

18) M. Vallet-Regí; A.J. Salinas; J. Ramírez-Castellanos and J.M. González-Calbet. Nanostructure of bioactive sol-gel glasses and organic-inorganic hybrids. *Chem. Mater.* 17: 1874-1879 (2005).

19) Faming Zhang, Jiang Chang, Jianxi Lu, Kaili Lin. Bioinspired structure of bioceramics for bone regeneration in load-bearing sites. *Acta Biomaterialia* 3: 896-904 (2007).

20) Hoque E, Shehryar M, Nurul K. Processing and characterization of cockle shell calcium carbonate (CaCO₃) bioceramic for potential application in bone tissue engineering. *J. Material Sci Eng* 2:132 (2013).

21) Combes C, Miao B, Bareille R, Rey C Preparation, physical-chemical characterisation and cytocompatibility of calcium carbonate cements. *Biomaterials* 27: 1945-1945 (2006)

22) Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* 63(15): 2223-2253 (2003).

23) Woo, K.M., Chen, V.J., Ma, P.X. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J. Biomed. Mater. Res.* 67A: 531-537 (2003).

24) Guarino, V., Taddei, P., Di Foggia, M., Fagnano, C., Ciapetti, G., Ambrosio, L. The influence of hydroxyapatite particles on "in vitro" degradation behavior of PCL based composite scaffolds. *Tissue Eng. Part A* 15: 3655-3668 (2009).

25) Washburn, N.R., Yamada, K.M., Simon Jr., C.G., Kennedy, S.B., Amis, E.J. High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: influence of nanometer-scale roughness on proliferation. *Biomaterials* 25: 1215-1224 (2004).

26) Lin Xiao, Bo Wang, Guang Yang and Mario Gauthier. *Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications*, Biomedical Science, Engineering and Technology, Prof. Dhanjoo N. Ghista (Ed.), ISBN: 978-953-307-471-9 (2012).