



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

BIOCOMPATIBILIDAD DE NANOFIBRAS DE PCL Y  
PCL/PRFC COMO MEMBRANA EN APLICACIONES  
PARA LA REGENERACIÓN PERIODONTAL.

**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:

MARIANA DOMÍNGUEZ NAVARRO

TUTOR: Dr. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ

ASESOR: M.C. OSMAR ALEJANDRO CHANES CUEVAS



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 todos aquellos a los que amo que están conmigo y a los que ya no, les agradezco todo lo que han hecho y dejado en mí.

Al Dr. Marco Antonio Alvarez, el M. en C. Osmar Alejandro Chanes y al Mtro. Pedro Alberto López, por toda la ayuda y conocimiento que me brindaron en este tiempo.

Agradezco al apoyo por parte del programa DGAPA-UNAM por el financiamiento al proyecto PAPIIT IT203618 y al Fondo Sectorial de Investigación para la Educación SEP-CONACYT por financiar al proyecto No. A1-S-9178 que me ha permitido la realización de esta investigación.

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>3. ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
3.1 Tejido periodontal.....	6
3.1.1. Encía.....	6
3.1.2. Ligamento periodontal.....	7
3.1.3. Hueso alveolar.....	8
3.1.3.1. Reparación y regeneración ósea.....	9
3.1.3.2. Cicatrización ósea.....	10
3.2. Enfermedad periodontal.....	11
3.2.1. Defectos óseos causados por la periodontitis.....	12
3.3. Materiales de regeneración ósea.....	13
3.3.1. Autoinjertos.....	14
3.3.2. Aloinjertos.....	14
3.3.3. Xenoinjertos.....	15
3.3.4. Aloplásticos.....	15
3.4. Membranas para regeneración.....	16
3.4.1. Membranas no reabsorbibles.....	16
3.4.2. Membranas reabsorbibles.....	16
3.5. Ingeniería de tejidos.....	17
3.6. Derivado de la matriz del esmalte.....	17
3.7. Plasma Rico en Plaquetas (PRP).....	18
3.7.1. Preparación del PRP.....	19
3.7.2. Aplicaciones de PRP.....	19
3.8. Plasma Rico en Fibrina (PRF).....	20
3.9. Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC).....	20
3.9.1. Preparación de PRFC.....	21
3.9.2. Factores de Crecimiento en el PRFC.....	22
3.9.3. Usos en humanos del PRFC.....	26
3.9.4. Estudios del PRFC realizados en animales.....	26
3.9.5. Estudios del PRFC realizados en humanos.....	27

3.9.6 Estudios de aislamiento y cultivo de células PDL humanas con PRFC.....	27
3.10. Andamios Nanofibrilares.....	28
3.11. Método de Hilado por Presión De Aire.....	29
3.12. Policaprolactona (PCL).....	30
3.13. Regeneración Odontogénica con andamios nanofibrilares.....	30
<b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>6. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>7. METODOLOGÍA.....</b>	<b>38</b>
7.1. Síntesis del andamio nanofibrilar de PCL y PCL/PRFC.....	39
7.2. Selección de pacientes.....	39
7.3. Extracción dental.....	40
7.4. Obtención del tejido de ligamento periodontal.....	40
7.5. Cultivo de fibroblastos derivados de ligamento periodontal (hPDL).....	41
7.6. Obtención del plasma rico en factores de crecimiento (PRFC).....	41
7.7. Contenido de proteínas.....	42
7.8. Gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida electroforesis (SDS-PAGE).....	42
7.9. Ensayo de Adhesión Celular.....	42
7.10. Ensayo de Viabilidad Celular (Citotoxicidad).....	43
7.11. Análisis de resultados.....	43
7.12. Cronograma.....	43
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
8.1. Adhesión celular.....	46
8.2. Viabilidad celular.....	46
8.3. Microscopía electrónica de barrido MEB.....	47

<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>59</b>
Espectro IR de PCL y PCL/PRFC.....	60
Gel de SDS-Page.....	61

# **1. RESUMEN**

Los estudios sobre el plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) se han desarrollado cada vez más y el conocimiento de su papel en la estimulación de la proliferación y diferenciación celular se utiliza con fines terapéuticos.

Para establecer el efecto de los andamios hilados de PCL y PCL/PRFC sobre la adhesión celular, las células aisladas de hPDL fueron cultivadas sobre la superficie de los andamios de PCL y PCL/PRFC en placas de cultivo de 24 pozos.

Las células adheridas a las membranas fueron fijadas con 4% de paraformaldehído. La adherencia celular fue evaluada de acuerdo al método de Cristal Violeta.

Para evaluar el efecto de los andamios hilados de PCL y PCL/PRFC sobre la viabilidad celular se llevó a cabo el ensayo de azul de triazol (MTT).

Se realizaron los estudios de cristal violeta (4 y 24 horas) y MTT (3, 5, 7, 14 días) obteniendo como resultado un aumento significativo en las membranas de PCL/PRFC en comparación con el PCL.

En dichos estudios se comprobó la biocompatibilidad y capacidad de las membranas para imitar las propiedades de la matriz extracelular fibrilar nativa del ligamento periodontal.

Contrastando los estudios anteriores con los resultados obtenidos en las membranas de PCL y PCL/PRFC es que tanto el PCL como PRFC tienen efectos biológicos favorables, y que al estar unidos en una membrana tienen como resultado un aumento en las propiedades de adhesión y viabilidad celular.

## **2. INTRODUCCIÓN**

La caries junto con la enfermedad periodontal son los padecimientos bucodentales con más alta prevalencia a nivel mundial. En México se ha reportado de un total de 115,248 sólo 43.2% de la población tenía un periodonto sano. En el grupo de 20 a 34 años, 50.4% no presentó enfermedad periodontal, mientras que en el grupo de 80 y más años únicamente 44.5% tenían un periodonto sano. Se observó que el porcentaje de pacientes sanos disminuye con la edad y la prevalencia de periodontitis aumentó con la edad según la (SIVEPAB) 2015.<sup>1</sup>

Esta enfermedad tiene diversas manifestaciones que si no son atendidas conllevan a la pérdida de los órganos dentales. Desde décadas pasadas se han realizado diversas terapias para el tratamiento de dicha enfermedad, muchas veces sin obtener el resultado esperado.

El PRFC es un plasma rico en plaquetas que contiene todas las proteínas y factores de coagulación plasmáticos, fue implementado por Anitua (2000), para diferentes funciones.

Existen nuevos enfoques que se inclinan hacia la regeneración en lugar de sólo cicatrización de los tejidos, como lo hace la bioingeniería que mezcla las técnicas de ingeniería proporcionando señalizaciones bioactivas, que han demostrado en diversos estudios su funcionalidad en cuestión de regeneración.

# **3. ANTECEDENTES**

### **3.1 Tejido periodontal**

Está conformado por tejidos de soporte y protección del diente (encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar).

Se divide en dos partes; la encía, cuya función principal es proteger a los tejidos subyacentes y el aparato de inserción compuesto de ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar.<sup>2</sup>

#### **3.1.1. Encía**

Desde el punto de vista anatómico, la encía se divide en marginal, insertada e interdental.

La encía está instituida por un núcleo central de tejido conectivo cubierto por epitelio escamoso estratificado.

En términos morfológicos y funcionales el epitelio se define en tres áreas diferentes, epitelio bucal externo, epitelio del surco y epitelio de unión. La función principal del epitelio gingivales proteger las estructuras profundas y permitir un intercambio selectivo con el medio bucal.

El tipo celular principal del epitelio gingival al igual que en todos los epitelios escamosos estratificados es el queratinocito.

El tejido conectivo de la encía marginal es de naturaleza densamente colágena y contiene un sistema predominante de haces de fibras gingivales, integradas por colágeno tipo I.

Las fibras gingivales poseen tres funciones:

- Aseguran firmemente la encía contra el diente.
- Proveen la rigidez necesaria para soportar las fuerzas de la masticación.
- Unen la encía marginal libre con el cemento de la raíz y la encía insertada contigua.

Las fibras gingivales se agrupan en tres grupos; gingivodentales, circulares y transeptales. Las tres clases de fibras del tejido conectivo son colágenas, reticulares y elásticas.

Los elementos celulares del tejido conectivo son:

- El fibroblasto, es el elemento celular preponderante del tejido conectivo gingival, estos sintetizan colágeno y fibras elásticas, así como glucoproteínas glucosaminoglicanos de la sustancia intercelular amorfa.
- Los mastocitos, distribuidos en todo el cuerpo.
- Los macrófagos fijos y los histiocitos, componentes del sistema mononuclear fagocítico.
- Adipocitos y eosinófilos, escasos, pero presentes en la lámina propia.
- Células plasmáticas y linfocitos, en focos pequeños en la encía clínicamente normal.
- Neutrófilos en cantidades altas en el surco.
- Leucocitos, en pequeñas cantidades que se consideran normales en la encía, o en el infiltrado inflamatorio incipiente. <sup>2</sup>

### **3.1.2. Ligamento periodontal**

Es un tejido conectivo celular altamente especializado que une la raíz del diente al hueso alveolar circundante para mantener la estabilidad y la función del diente. El ligamento periodontal consiste en una población celular heterogénea que incluye fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, cementoblastos y restos de células epiteliales de Malassez y contiene progenitores que son capaces de diferenciarse en osteoblastos y cementoblastos.

Las funciones del ligamento periodontal son físicas, formativas y de remodelación, nutricionales y sensitivas. <sup>2</sup>

Se ha identificado específicamente una población de células troncales del ligamento periodontal humano (PDLSC por sus siglas en inglés) que expresan marcadores de células estromales mesenquimales. Los PDLSCs representan una población de células troncales mesenquimales únicas, como lo demuestra su capacidad para generar un tejido similar al cemento y principalmente regenerar el ligamento periodontal *in vivo*.

Los PDLSC se han propuesto recientemente como agentes novedosos en terapias para la ingeniería tisular de tejidos periodontales, incluido el cemento, las fibras de Sharpey y el hueso alveolar. <sup>3</sup>

### 3.1.3. Hueso alveolar

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conjuntivo que está compuesto por células y matriz extracelular. La característica que distingue al tejido óseo de otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz, la cual produce un tejido muy duro capaz de proveer sostén y protección. El mineral es fosfato de calcio en la forma de cristales de hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6OH_2]$ . El principal componente estructural de la matriz ósea es el colágeno tipo I, y en menor cantidad el tipo V, también se han encontrado vestigios de colágeno tipo III, XI y XIII. Todas las moléculas de colágeno constituyen alrededor del 90% del peso total de las proteínas de la matriz extracelular ósea.

Los cuatro grupos principales de proteínas no colágenas que hay en la matriz ósea son:

- Macromoléculas de proteoglicanos, que contienen una proteína central con cantidades diversas de cadenas laterales de glucosaminoglicanos (hialurano, condroitín sulfato y queratán sulfato). Contribuyen a que el tejido óseo ofrezca resistencia a la compresión y también tienen a cargo la fijación de los factores de crecimiento e inhibirán la mineralización.
- Glucoproteínas multiadhesivas, que actúan en la adhesión de las células óseas y las fibras colágenas de la sustancia fundamental mineralizada. Algunas de las glucoproteínas más importantes son la osteonectina, las sialoproteínas I y II, y la osteopontina.
- Proteínas dependientes de vitamina K osteoespecíficas, que incluyen la osteocalcina, la proteína S y la proteína Gla matricial (MGP por sus siglas en inglés).
- Factores de crecimiento, citocina, proteínas morfogenéticas óseas (BMP por sus siglas en inglés) y las interleucinas.

En la matriz ósea hay espacios llamados lagunas, las cuales cada uno de ellas contiene un osteocito.

Los osteocitos extienden una gran cantidad de prolongaciones en túneles estrechos denominados canalículos, que atraviesan la matriz mineralizada para conectar las lagunas contiguas y permitir el contacto entre las prolongaciones de osteocitos vecinos.

Además de los osteocitos, en el tejido óseo hay otros cuatro tipos celulares:

- Células osteoprogenitoras, que son células derivadas de células troncales mesenquimales.
- Osteoblastos, son células que secretan la matriz extracelular y mineralizan formando el tejido óseo, se diferencian de células foliculares pluripotenciales.
- Células de revestimiento óseo, permanecen en la superficie ósea cuando hay crecimiento activo.
- Osteoclastos, que son células de resorción ósea presentes en las superficies óseas donde el hueso se ha eliminado, se está remodelando o donde el hueso se ha lesionado. <sup>4</sup>

### **3.1.3.1. Reparación y regeneración ósea**

Se entiende como reparación de un tejido a la restauración del mismo sin que éste, conserve su arquitectura original ni tampoco su función y como regeneración cuando la restauración de dicho tejido posee propiedades indistinguibles del tejido original.

Cuando el tejido cicatriza en vez de regenerarse es porque puede contener las células necesarias para la regeneración, pero le faltan células estimuladoras.

Para que el hueso se regenere, las células troncales mesenquimales (MSCs por sus siglas en inglés) específicas deben ser reclutadas, proliferar y diferenciarse en células osteogénicas.<sup>5</sup>

La regeneración del tejido óseo implica el acoplamiento de formación y resorción del hueso en una unidad multicelular básica (UMB). <sup>6</sup>

Si las células mesenquimales de el ligamento periodontal o de la región perivascular del hueso proliferan y colonizan la superficie de la raíz, ocurrirá la regeneración. Alternativamente si el tejido perdido es reemplazado por el tejido cicatrizal que, ocurrirá la reparación. <sup>7</sup>

El proceso de remodelación ósea implica las siguientes etapas:

- Activación de células osteogénicas precursoras.

- Absorción activa del hueso (reabsorción).
- Periodo de descanso.
- Formación de hueso nuevo.

La formación de hueso por los osteoblastos se da en la zona que ha sido absorbida por los osteoclastos; las lagunas de absorción osteoclástica (lagunas de Howship) se repueblan por un contingente de osteoblastos que fabrica osteoide o hueso joven, el cual calcifica, quedando restaurado el hueso. <sup>8</sup>

### **3.1.3.2. Cicatrización ósea**

La cicatrización del tejido lesionado lleva a la formación de un tejido cuya morfología o función difieren de la del tejido original. La cicatrización del hueso incluye los fenómenos de regeneración y reparación, según la naturaleza de la lesión. <sup>6</sup>

La lesión inicia una respuesta inflamatoria necesaria para que la cicatrización progrese, generando un hematoma que consiste de células de ambos tipos de sangre, periférica e intramedular, así como de células de la médula. <sup>9</sup>

En el desarrollo de ambos maxilares, el cráneo y la clavícula, las células progenitoras mesenquimales se condensan y se diferencian en osteoblastos en forma directa, proceso conocido como osteogénesis intramembranosa. En cambio el cóndilo mandibular, los huesos largos, y las vértebras al comienzo se forman sobre la base de un molde de cartílago que sirve de sustento y que es reemplazado por el hueso en forma gradual. Esta formación se conoce como osteogénesis endocondral.

Durante la osteogénesis intramembranosa se desarrolla un centro de osificación mesenquimatosa, A medida que la matriz extracelular rica en colágena se forma y madura, las células osteoprogenitoras prosiguen su diferenciación osteoblástica. En las superficies externas del centro de osificación se forma peristilo fibroso sobre una capa de osteoblastos. A medida que se neoforman los osteoblastos se produce el crecimiento por aposición, una subpoblación de osteoblastos queda incluida en la matriz mineralizadora y de origen a la red lacunocanalicular de osteocitos.

En el proceso de regeneración, la resorción ósea hecha por los osteoclastos ocurre primero durante un período de 3-4 semanas, junto con la señalización celular

para atraer a los osteoblastos hacia la zona. Entonces, los osteoblastos forman hueso durante 3-4 meses, con un período latente entre la resorción y la formación de hueso, denominada fase de reversión. En el hueso trabecular experimenta un grado significativamente más alto de recambio óseo que hueso cortical.<sup>6</sup>

La cicatrización ósea endocondral consta de seis fases:

- Formación del callo óseo, el hematoma coagula entre los extremos de la fractura, alrededor de ellos y dentro de la médula. La respuesta inicial pro-inflamatoria implica la secreción de factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), IL6, IL-11, e IL-18. Estos factores promueven la angiogénesis.<sup>5</sup>
- La fase trófica de la cicatrización, se caracteriza por la proliferación celular y la migración de diferentes tipos de células.
- La fase de proliferación comienza con la formación de fibrina, fibronectina glucosaminoglicano, y la matriz de ácido hialurónico que es inicialmente poblada con macrófagos y plaquetas. Las células progenitoras de células madre contribuyen a la colección y proliferación de células progenitoras.
- La angiogénesis ocurre con la formación de nuevas redes capilares a través de la migración y división celular endotelial.
- Síntesis de la matriz extracelular.
- En la fase de remodelación existe un equilibrio entre la síntesis, la deposición y la degradación durante esta fase. El cambio más dramático ocurre en el tipo general, cantidad y organización de las fibras de colágeno.<sup>9</sup>

### **3.2. Enfermedad periodontal**

Se define como una enfermedad inflamatoria de los tejidos de los dientes causada por microorganismos o grupos de microorganismos específicos que producen la destrucción progresiva del ligamento y el hueso alveolar con formación de bolsa, recesión o ambas.

La clasificación resultante se simplificó para describir tres manifestaciones clínicas generales de la periodontitis:

- Periodontitis crónica, es la forma más frecuente de periodontitis, esta se vincula con la acumulación de placa, bacterias y cálculo, y suele tener un ritmo de progresión lento a moderado, pero se observan periodos de destrucción más rápida. Ocurre como una enfermedad localizada en la que <30% de los sitios valorados presentan pérdida de inserción y de hueso o como una enfermedad más generalizada en la que el >30% de los sitios está afectado. También puede describirse por su intensidad como: leve, moderada y severa sobre la base de magnitud de la pérdida de inserción clínica.
- Periodontitis agresiva, difiere de la forma crónica básicamente por la rapidez de la progresión en personas por lo demás sanas, ausencia de grandes acumulaciones de placa, bacterias y cálculo, y antecedentes familiares de enfermedad agresiva que señala un rasgo genético. La enfermedad puede ser localizada, como la periodontitis juvenil localizada (PJL), periodontitis juvenil generalizada (PJG) y periodontitis rápidamente progresiva (PRP).
- Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas, varias alteraciones hematológicas y genéticas se relacionan con periodontitis en individuos afectados. Su diagnóstico es aplicable cuando la enfermedad general es el factor predisponente principal, y factores locales como grandes cantidades de placa y cálculos no son evidentes. Los factores que exacerban la aparición de las afecciones son diabetes mellitus o infección por VIH.<sup>2</sup>

### **3.2.1. Defectos óseos causados por la periodontitis**

La pérdida del hueso alveolar es uno de los signos característicos de la enfermedad periodontal y generalmente se considera que representa la secuela anatómica de la diseminación apical de la periodontitis.

Un primer nivel de clasificación distingue entre defectos de supraóseos, infraóseos y defectos interradiculares o de furcación.

De acuerdo con la clasificación de Goldman & Cohen, los defectos supraóseos son aquellos en los que la base de la bolsa se ubica en posición coronal a la cresta alveolar. Los defectos de infraóseos, por otro lado, se definen por la ubicación apical de la base de la bolsa con respecto a la cresta alveolar residual. Con respecto a los defec-

tos infraóseos, se pueden reconocer dos tipos de defectos: defectos intraóseos y cráteres. Los defectos intraóseos son defectos óseos cuyo componente infraóseo afecta principalmente a un diente, mientras que en los cráteres el defecto afecta a dos superficies radiculares adyacentes en una medida similar.

Los defectos infraóseos se han clasificado de acuerdo con su morfología en términos de paredes óseas residuales, ancho del defecto (o ángulo radiográfico) y en términos de su extensión topográfica alrededor del diente. Los defectos de tres paredes, dos paredes y una pared se han definido en función del número de paredes óseas alveolares residuales.

Con frecuencia, los defectos intraóseos presentan una anatomía compleja que consiste en un componente de tres paredes en la porción más apical del defecto, y componentes de dos y / o una pared en las porciones más superficiales. Dichos defectos a menudo se denominan defectos de combinación. Los defectos hemiseptales, es decir, los defectos verticales en presencia de raíces adyacentes y donde la mitad del septo permanece en un diente, representan un caso especial de defectos en una pared.

Las condiciones que implican la resorción patológica del hueso dentro de la furcación de un diente de múltiples raíces, se clasifican en: clase I, lo que indica una pérdida mínima, pero notable, de hueso en una furcación; clase II, mostrando un variable grado de destrucción ósea en una furcación pero sin exceder completamente a través de ésta; y clase III, en los que la resorción ósea se extiende completamente a través de la furcación. <sup>10</sup>

### **3.3. Materiales de regeneración ósea**

Un material de reemplazo óseo debe de poseer características de biocompatibilidad, no ser citotóxico y que sea bueno resistiendo la infección. En adicional, un costo razonable, de fácil manipulación y fácilmente obtenible. Debe además poseer algunas propiedades de potencial regenerativo, ejemplo; osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción. El injerto osteoinductivo provee de estímulos para la diferenciación de células de formación ósea, mientras que el material osteoinductivo sólo sirve como un

andamio para la migración y crecimiento de células óseas. Estos materiales de reemplazo óseo son clasificados en cuatro categorías; autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos y aloplásticos.

### **3.3.1. Autoinjertos**

Se obtienen del mismo individuo, posee propiedades osteogénicas de osteoinducción y osteoconducción, tiene la ventaja de eliminar las posibles complicaciones de histocompatibilidad y no existe el riesgo de transmisión de enfermedades. Sus desventajas son: una disponibilidad limitada, una intervención quirúrgica adicional y posibles complicaciones como, resorción ósea y anquilosis. El injerto de hueso esponjoso y de la médula posee mejor potencial de inducción y osteogénesis.

Las indicaciones para el auto injerto son:

- Defecto clase II de furcación.
- Defectos periodontales con dos y tres paredes.
- Defectos periimplantarios de dos paredes o circunferenciales.
- Aumento horizontal de la cresta: OGB (onlay bone grafting), división/ expansión de la cresta, GBR (guided bone regeneration).
- Elevación del piso del seno maxilar.

### **3.3.2. Aloinjertos**

Son recolectados de diferentes individuos de la misma especie, cuenta con propiedades osteoinductivas y osteoconductoras, con ventajas de posible osteogénesis y elimina la necesidad de una segunda cirugía en el sitio. Es posible su antigenicidad y potencial de transmisión de enfermedades. En cambio, los aloinjertos óseos liofilizados FDA (Freeze-dried bone allograft) y los DFDBA (DeminerIALIZED Freeze-dried bone allograft) están ampliamente disponibles en los bancos de tejidos. Comparando el DFDBA, FDA tiende a reabsorberse más lentamente. El DFDBA tiene un potencial de osteoconducción con mayor expresión de hueso con proteína morfogenética. Por lo

tanto, DFDBA es indicado para la regeneración periodontal, mientras que el FDBA es más recomendable para procesos de aumento.

Existen 3 tipos de características en los aloinjertos, los DFDBA, los FDBA y la mezcla de ambos. Dentro de sus indicaciones están:

- Defecto clase II de furcación.
- Defectos periodontales con dos y tres paredes.
- Defectos periimplantarios de dos paredes o circunferenciales.
- Aumento horizontal de la cresta: OGB (onlay bone grafting), división/ expansión de la cresta, GBR (guided bone regeneration).
- Elevación del piso del seno maxilar.

### **3.3.3. Xenoinjertos**

Son obtenidos de otras especies diferentes a los humanos, como son bovinos, porcinos y corales. No necesitan intervención quirúrgica adicional y tienen una tasa de reabsorción lenta, poseen propiedades de osteoconducción y posible osteoinducción.

Sus indicaciones son:

- Defectos periimplantares de dos paredes o circunferenciales.
- Aumento horizontal de la cresta: OGB (onlay bone grafting), división/ expansión de la cresta, GBR (guided bone regeneration).
- Elevación del piso del seno maxilar.

### **3.3.4. Aloplásticos**

Son injertos sintéticos que incluyen productos de hidroxapatita absorbible/ no absorbible (HA), fosfato b-tricálcico (b-TCP) polímero de polimetilmetacrilato y polímero de capa de calcio hidroxietilmetacrilato, polímero de ácido poliacético y materiales de bioglass.

Los aloplásticos son solo osteoconductores y tienen una tasa de reabsorción lenta y tienen las mismas indicaciones que los xenoinjertos.<sup>11</sup>

### **3.4. Membranas para regeneración**

Clásicamente, la regeneración tisular guiada (RTG) es asociada con el uso de membranas, ya sean no reabsorbibles o reabsorbibles.

#### **3.4.1. Membranas no reabsorbibles**

En estudios en animales y humanos demostraron la eficacia de la RTG cuando fueron utilizados los filtros de acetato de celulosa. La primer membrana fue producida por politetrafluoretileno expandido (ePTFE por sus siglas en inglés), esta membrana tiene todas las propiedades necesarias de barrera para la RTG, por ejemplo; 1) barrera celular, 2) es biocompatible, 3) provee el espacio para la cicatrización del tejido, 4) permite la integración tisular, y 5) es clínicamente manejable. Es bien aceptada en regeneración ósea guiada (ROG), y preservación de la cresta. Se ha demostrado que esta membrana utilizada en defectos infraóseos o de furcación tiene una ganancia clínica de nivel de fijación de 3 a 6 mm mejorando el nivel de hueso (2 a 4.8 mm) y una reducción a la profundidad del sondeo (3.5 a 6 mm).

#### **3.4.2. Membranas reabsorbibles**

Básicamente existen tres tipos de membranas bioreabsorbibles; 1) polímero poliglicósido sintético, 2) colágeno, y 3) sulfato de calcio. Las membranas de poliglicósido se degradan como resultado de la escisión no enzimática del polímero.

Las membranas de colágeno son actualmente disponibles de origen bovino y porcino, ya sean de colágeno tipo I o en combinación de colágeno tipo I y III. Estas membranas son degradadas por la colagenasa y subsecuentemente por la gelatinasa y la peptidasa.

El resurgimiento del sulfato de calcio como material de regeneración ha sido por que funciona como una buena barrera reabsorbible utilizada en combinación con hueso

o sustitutos de hueso. El sulfato de calcio es bioreabsorbido a través de una reacción de células gigantes.

La desventaja de las membranas reabsorbibles es su relativa ausencia de rigidez a diferencia de las membranas de ePTFE reforzadas de titanio.

Se mostró un nivel de fijación clínico mejorado de un 78% a 79% en los sitios mejorando 4 mm o más. En promedio se lleno 3 mm de hueso. <sup>7</sup>

### **3.5. Ingeniería de tejidos**

La ingeniería tisular es la ciencia que combina los principios de biología celular, ciencia de materiales y biomédica. Incluye técnicas de ingeniería para obtener sustitutos biológicos para regenerar, reemplazar, modificar, reparar o restaurar la función de órganos y tejidos.

Actualmente el enfoque más común es utilizar andamios biodegradables en forma del nuevo tejido que se siembra con células madre o células autólogas. Los polímeros sintéticos se pueden fabricar con diferentes tiempos de degradación, propiedades mecánicas, forma y porosidad, pero tienen baja adhesión celular, baja ductilidad y baja bioactividad. Ejemplos: ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PCL), polimetacrilato de metilo (PMMA) y polisebacato de glicerol.<sup>12</sup>

La tríada de ingeniería de tejidos, se derivó de los tres componentes principales de los tejidos: las células, su MEC y un sistema de señalización. La identificación de señales espaciales y temporales (factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas), para la diferenciación y morfogénesis específicas del tejido y el enfoque para suministrar estas señales representan opciones de diseño a lo largo del tercer eje de la tríada.

13

### **3.6. Derivado de la matriz del esmalte**

La razón fundamental del mecanismo de acción del derivado de la matriz de esmalte (DME) es que contiene una preparación de proteínas que imita la matriz de pro-

teínas que inducen la cementogénesis. Durante el desarrollo de la raíz la vaina epitelial de Hertwig deposita proteínas de la matriz extracelular en la nueva formación de dentina en la superficie radicular. Estas proteínas estimulan la diferenciación al rededor de las células mesenquimales dentro de los cementoblastos formando cemento acelular.

El DME es un ácido acético extraído de una preparación de proteínas del desarrollo de los dientes porcinos que contiene una mezcla de proteínas de bajo peso molecular. El mayor compuesto es la amelogenina que es una proteína altamente hidrofóbica. Otras proteínas identificadas incluyen la ameloblastina y la enamelina.<sup>7</sup>

### **3.7. Plasma Rico en Plaquetas (PRP)**

El PRP es la primera generación de la preparación de la sangre centrifugada. Se refiere a un producto formado por plaquetas concentradas en un volumen limitado de plasma utilizado en diversos procedimientos de regeneración del tejido quirúrgico donde los factores de crecimiento que tienen las plaquetas favorecen la cicatrización y la regeneración de tejidos. Presenta un protocolo sencillo de preparación, bioseguridad y versatilidad.<sup>9</sup>

En las primeras etapas del proceso de cicatrización, los factores de crecimiento polipeptídicos (FCP) dentro del PRP atraen células mesenquimales indiferenciadas dentro de la matriz de fibrina y desencadenan la división celular. Favorece la proliferación de progenitores del tejido conectivo, la estimulación de los fibroblastos y la actividad de los osteoblastos y la angiogénesis que son pasos cruciales en el proceso de cicatrización y regeneración.

Algunas aplicaciones terapéuticas potenciales de productos ricos en plaquetas incluyen regeneración ósea y osteointegración del implante de titanio más rápidamente.

14

Tiene concentraciones de PDGF y PGF- $\beta$  de 41.1 y 45.9 ng/ml, respectivamente. Se han identificado anticuerpos monoclonales presentes de PDGF, IGF, y PGF- $\beta$ .<sup>7</sup>

Las presentaciones del PRP se clasifican en; hidrogenes y esponjas, geles y geles planetarios solos.<sup>15</sup>

En el PRP la presencia de plaquetas es el principal componente. La concentración normal de las plaquetas en la sangre está entre 150.000 y 300.000 por  $\mu\text{l}$ .

Las plaquetas no tienen núcleos ni pueden reproducirse. En sus citoplasma hay factores activos del tipo: 1) moléculas de actina y de miosina, la tromboastenina que puede contraer las plaquetas, 2) restos del retículo endoplásmico y de aparato de Golgi, 3) las mitocondrias y los sistemas enzimáticos 4) sistemas enzimáticos que sintetizan prostaglandinas, 5) una proteína llamada factor estabilizador de fibrina; 6) un factor de crecimiento que hace que las células endoteliales vasculares, las células vasculares lisas y los fibroblastos se multipliquen y crezcan, lo que provoca el crecimiento vascular.<sup>8</sup>

Los factores de crecimiento están contenidos en los granulos  $\alpha$  de las plaquetas y poseen un papel activo en la regeneración.<sup>16</sup>

### **3.7.1. Preparación del PRP**

El PRP se puede preparar fácilmente a partir de la propia sangre del paciente mediante centrifugación y se separa en tres fracciones: plasma pobre en plaquetas (PPP) (adhesivo o pegamento de fibrina); PRP; Y los glóbulos rojos. Las plaquetas se enriquecen un 338% en la preparación de PRP. PPP es la capa superior obtenida después de la centrifugación sanguínea en la que los recuentos plaquetarios son despreciables y se compone de plasma acelular que contiene fibrinógeno y factores de crecimiento plasmáticos. PRP es la capa inferior y es un volumen de plasma autólogo que tiene una concentración de plaquetas aproximadamente 3-4 veces más alta que los niveles basales (150000-450000 /  $\mu\text{l}$ ).<sup>14</sup>

### **3.7.2. Aplicaciones de PRP**

Tiene muchas moléculas mensajeras que pueden dirigir y modular una serie compleja de eventos que involucran las diferentes etapas de curación de tejidos blandos y duros. El PRP es relativamente fácil de aplicar localmente para acelerar la curación del tejido blando y duro.<sup>17</sup>

- Aumenta la curación de lesiones ligamentosas, los FCs (PDGF, TGF $\beta$ 1 y bFGF por sus siglas en inglés) están activamente involucrados durante la fase temprana de la consolidación del ligamento colateral mediano y del ligamento cruzado anterior (LCA).
- Mejora la síntesis de la matriz.<sup>18</sup>
- Mejora la curación ósea al inducir la proliferación de las células de los osteoblastos y promover la osteogénesis.
- Aumento de la cresta alveolar o el aumento del seno maxilar.
- Curación de tejidos blandos, en combinación con matriz dérmica acelular.

Sin embargo, un estudio de injerto de tejido conectivo concluyó que el PRP no mejoraba la cicatrización de los tejidos blandos o la cobertura de la raíz en comparación con un injerto de tejido conectivo sin PRP.<sup>17</sup>

### **3.8. Plasma Rico en Fibrina (PRF)**

Es la segunda generación de concentrados de plaquetas adaptados a la preparación simplificada sin procedimientos bioquímicos de manejo de sangre, se produjo por primera vez para uso especializado en cirugía oral y maxilofacial. Debido a la consistencia sólida de la fibrina, la PRF se destruye lentamente por remodelación, similar a un coágulo de sangre natural. Dependiendo de la liberación local y continua de una amplia gama de factores de crecimiento, PRF promueve los procesos de curación de heridas y reparación de tejidos. Recientemente, el PRF se ha utilizado como material de andamiaje para la ingeniería tisular y la regeneración de diversos tejidos, como el tejido perióstico, el ligamento periodontal, el tejido blando maxilofacial, la pulpa dental y el miocardio.<sup>19</sup>

### **3.9. Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRFC)**

Es una fracción plasmática obtenida mediante una centrifugación lenta, que contiene un plasma rico en plaquetas con todas las proteínas y factores de coagulación plasmáticos.

Contiene entre otras proteínas PDGF, VEGF, TGF- $\beta$ , FGF e IGF-I.<sup>8</sup>

Es posible obtener diferentes preparaciones autólogas ricas en factores de crecimiento de la misma sangre del paciente dependiendo de la coagulación y el grado de activación de las muestras. Una de estas preparaciones es el PRFC como andamio compuesto de componentes celulares y fibrilares, y otro muy interesante es el PRFC líquido, que puede utilizarse para humidificar y bioactivar las superficies de los implantes dentales para mejorar su osteointegración. En particular la característica del PRFC como andamio es la configuración 3D con un amplio rango de liberación de proteínas biológicamente activas. Por otra parte, el PRFC líquido puede utilizarse para humidificar los implantes dentales y mejorar su osteointegración. Inicialmente, se usa cloruro de calcio en lugar de trombina bovina como agente activador, ya que este proporciona una liberación más controlada de los factores de crecimiento y evita los riesgos potenciales asociados a la trombina bovina. Como consecuencia tanto el PRFC como andamio o líquido son 100% autólogos. Otras ventajas son la versatilidad, rentabilidad, y bioseguridad de estos productos. <sup>20</sup>

### **3.9.1. Preparación de PRFC**

Esta técnica ha sido desarrollada por el laboratorio Biotechnology Institute (BTI), consiste en la extracción de 20 centímetros cúbicos de sangre del paciente. La cual se centrifuga para diferenciar las distintas fracciones de plasma y separar la porción más rica en factores de crecimiento.

Esta técnica consiste en:

1. La selección de las venas y la extracción de 20 centímetros cúbicos de sangre.
2. La introducción de la sangre en tubos estériles con citrato de sodio al 3.8% como anticoagulante. Se centrifuga donde se obtienen tres fracciones: Fracción 1, corresponden a los primeros 500  $\mu$ L (0.5 cc) que se considera un plasma pobre en plaquetas. Fracción 2, corresponden a los siguientes 500  $\mu$ L (0.5 cc) obteniendo un plasma con un número de plaquetas similar al que tiene la sangre periférica. Fracción 3, los siguientes 500  $\mu$ L (0.5 cc) considerando la porción del plasma más rica en plaquetas, encontrándose inmediatamente después de la serie roja.

3. Pipeteo de las muestras. Los 0.2 cc de plasma que están más próximos a los hematíes son los que tienen el contenido más alto en plaquetas.
4. Activación y agregación de las plaquetas. Se realiza la activación del coágulo utilizando cloruro de calcio al 10% para inducir la activación plaquetaria y la exocitosis de los gránulos  $\alpha$ . El calcio actúa como cofactor necesario para la agregación plaquetaria.

Se forma un tapón gelatinoso muy consistente y de fácil manipulación. Cuando se activa se inicia la cascada de coagulación, con la transformación de las plaquetas se liberan los factores de crecimiento. El gel obtenido de color amarillo-rosado contiene PRFC y el de color transparente es el PPP (plasma pobre en plaquetas).<sup>20</sup>

### **3.9.2. Factores de Crecimiento en el PRFC**

Los factores de crecimiento son señales bioquímicas capaces de modificar las respuestas de las células del organismo. Son péptidos, es decir, secuencias cortas de aminoácidos. Se trata habitualmente de proteínas solubles que actúan de mediadores biológicos naturales siendo responsables de distintos eventos celulares como la mitosis, quimiotaxis, la citodiferenciación y la síntesis de la matriz entre otros. La síntesis de los factores de crecimiento se encuentra mediada por receptores de membrana específicos en la superficie celular, sobre los cuales a su vez ellas actúan, promoviendo una proliferación o una inhibición en diferentes situaciones.

Estos se clasificarán según su especialidad en amplios y reducidos, los de especialidad amplia actúan sobre muchas clases de células mientras que los reducidos solo actúan sobre un tipo de células.

Entre los tipos celulares productores de los factores de crecimiento están los fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales y leucocitos, especialmente monocitos y macrófagos.

Se incluyen como desencadenantes de activación de los factores: el traumatismo accidental o quirúrgico, del tejido óseo.<sup>21</sup>

### a) **Proteínas morfogenéticas óseas (BMP)**

Son polipéptidos multifuncionales pertenecientes a la super familia del factor de crecimiento transformante-beta de las proteínas. El genoma humano codifica al menos 20 proteínas morfogenéticas óseas. Estas se unen a receptores de tipo I y tipo II que funcionan como serinetreonina quinasa. La proteína del receptor de tipo I fosforila los sustratos de señalización intracelular llamados Smads. La característica más notable de las proteínas morfogenéticas óseas es su capacidad para inducir la formación de hueso ectópico. Las proteínas morfogenéticas óseas no sólo son poderosos reguladores de la formación de cartílagos y huesos durante el desarrollo embrionario y la regeneración en la vida postnatal, sino que también participan en el desarrollo y reparación de otros órganos como el cerebro, los riñones y los nervios.<sup>12</sup>

### b) **Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés)**

Es miembro de una familia de polipéptidos multifuncionales que se unen a dos receptores de tirosina quinasa de membrana celular que posteriormente ejerce sus efectos biológicos sobre la proliferación celular, síntesis de MEC y anti-apoptosis. Los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas -a y -b se expresan en tejidos blandos y duros periodontales regeneradores. Además, este factor inicia la quimiotaxis de las células del ligamento periodontal que sostiene los dientes, la mitogénesis, la síntesis de la matriz, y la fijación a las superficies dentales.<sup>22</sup>

Se identificó dos formas PDGF-I y PDGF-II. Se trata de una proteína cuyo peso molecular es de 30 kDa, es un dímero formado por dos cadenas de aminoácidos A y B. Estas dos cadenas tienen una similitud del 60% en su estructura.

El PDGF es el primer factor de crecimiento que se demostró que era quimiotáctico para monocitos y macrófagos.

Existen dos tipos diferentes de receptores de membrana a los que se une PDGF, denominados alfa y beta. El receptor alfa es una proteína de 170 kDa y el receptor beta

una a proteína de 190 KDa. Ambos receptores inducen respuestas mitogénicas; el receptor  $\beta$  está implicado en la estimulación de la quimiotaxis, mientras que alfa no.<sup>8</sup>

Curiosamente, el PDGF parece disminuir la expresión del ARNm de IGF en osteoblastos, mientras que las BMP aumentan la expresión de IGF ARNm.<sup>21</sup>

### **c) Factor de Crecimiento Insulínico (IGF-I y II por sus siglas en inglés)**

Son polipéptidos anabólicos estructuralmente relacionados con la insulina. El IGF, es producido en las células óseas y es almacenado en altas concentraciones dentro de la matriz ósea, se considera que regulan las células óseas a través de ambas vías, la autocrina y la paracrina. El IGF-I es el más abundante en la matriz ósea. Lo producen los osteoblastos y estimula la formación de hueso induciendo la proliferación celular, también aumenta el número de células multinucleadas osteoclasticas.<sup>8</sup>

### **d) Factor de Crecimiento Transformante Alfa y Beta ( TGF- $\alpha$ y TGF- $\beta$ por sus siglas en inglés)**

El TGF- $\alpha$  tiene efectos en el aumento de la proliferación y migración de células epiteliales, la liberación de iones de calcio del hueso y en la inhibición de la actividad de los osteoblastos. Además tiene efecto angiogénico e interviene en el desarrollo tumoral por medio de dos mecanismos; uno, estimulando la proliferación celular por un mecanismo autocrino, y otro, induciendo la angiogénesis tumoral mediante un mecanismo paracrino.

El TGF- $\beta$  es una familia de proteínas que incluye, activinas, a la proteína morfológica ósea, y las citocinas. Los miembros de de la familia del TGF- $\beta$ , regulan diferentes funciones celulares como la proliferación, apoptosis, diferenciación, migración, y tienen un papel clave en el desarrollo del organismo. También está implicado en varias patologías humanas, incluyendo desórdenes autoinmunes y vasculares, así como enfermedades fibróticas y cáncer.

Se dividen en dos grupos TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 que son mediadores locales cuyas principales actividades son estimular la quimiotaxis y la mitosis de células osteoprogenitoras. Actúan sobre los osteoclastos inhibiendo la resorción ósea, también actúan sobre los fibroblastos y células endoteliales. Promueve la formación de matriz extracelular, posee pocos efectos en la formación de fibroblastos, inhibe la proliferación de células epiteliales y aumenta la expresión de los receptores de PDGF. <sup>21</sup>

Es un factor de crecimiento multifuncional altamente expresado en los tejidos gingivales sometidos a inflamación y cicatrización de heridas, es el principal mediador responsable de la diferenciación de miofibroblastos.<sup>23</sup>

#### **e) Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF)**

Promueve la angiogénesis. Forma la vasculatura madura. Reclutar células de médula ósea en el sitio de la herida e induce la vascularización. Además, los estudios han demostrado que el VEGF induce la movilización de las células de la médula ósea en el torrente sanguíneo y el desplazamiento de las células mieloides circulantes hacia el órgano diana respectivo.<sup>17</sup>

#### **f) Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF)**

Existen dos tipos: FGF ácido y FGF básico <sup>21</sup> , promueve la producción de colágeno, estimula la angiogénesis y la proliferación de mioblastos.<sup>18</sup>

Estimulan la mitosis y migración de las células endoteliales y por otro lado la estimulación y coordinación de la mitogénesis de múltiples tipos celulares como células de origen mesenquimatoso, como los fibroblastos, los osteoblastos, condrocitos, células musculares lisas y mioblastos, mantenimiento y reparación celular. <sup>21</sup>

### **3.9.3. Usos en humanos del PRFC**

1. Elevación del piso de seno transcrestal, mejora a la osteointegración y el cociente de la estabilidad del implante a las 12 semanas después de su colocación. Tiene favorables efectos para la cicatrización de tejido suave y reducción de las disconformidades postoperatorias.<sup>17</sup>
2. Defectos periodontales distales de segundos molares después de la extracción del tercer molar.<sup>24</sup>
3. Implantes dentales, la aplicación de factores de crecimiento para promover la osteogénesis y la osteointegración guiando la diferenciación celular, el proceso de formación de tejido y la vascularización del hueso recién formado.<sup>25</sup>
4. Preparación de áreas futuras, las zonas post-extracción epitelizarán más rápido, se obtendrá regeneración ósea en menor tiempo y las posibilidades de infección o alveolitis seca desaparecerán.
5. Apicectomías, tratamiento de defectos óseos periapicales.<sup>8</sup>

### **3.9.4. Estudios del PRFC realizados en animales**

Se realizó un estudio en tres cabras adultas. Los resultados demuestran que el PRFC líquido favoreció y mejoró el contacto implante óseo de los implantes de titanio rugoso. También sugiere que el PRFC formó más hueso que el control, lo que significa una aceleración de la regeneración ósea en los defectos artificiales.<sup>16</sup>

Existe otro estudio desarrollado en conejos que fueron implantados en su tibia. Este análisis evaluó si la adición del factor de crecimiento rhPDGF-BB afecta la fase temprana de la osteointegración de los implantes dentales de titanio. Los resultados de este estudio sugieren que la adición del factor de crecimiento rhPDGF-BB disminuye las propiedades de salud medulares y crestales óseas tempranas alrededor de los implantes dentales, mientras que tiene el efecto opuesto en la última fase de la formación ósea. Esta respuesta proporciona estabilidades más fuertes, lo cual es de gran importancia para una osteointegración exitosa, especialmente en ambientes óseos no óptimos.<sup>25</sup>

### **3.9.5. Estudios del PRFC realizados en humanos**

Se realizó los estudios de todos los pacientes que experimentaron una ruptura de la membrana sinusal. Se usó PRFC para tratar la fenestración, los pacientes fueron colocados en el grupo de prueba, y lo contrario en el grupo de control. Los datos clínicos de nueve hombres y 11 mujeres se incluyeron en el estudio.

Los resultados fueron favorables en los concentrados de plaquetas donde también se observaron como una opción en la cirugía del seno maxilar favoreciendo la cicatrización del tejido duro y blando en el sitio quirúrgico y mejorando la neoformación ósea.

Uno de los principales aspectos favorables es que algunos de los componentes derivados de plaquetas tienen la capacidad de reducir las respuestas inflamatorias después de la cirugía, lo que afecta positivamente a la calidad de vida postoperatoria de los pacientes.<sup>26</sup>

### **3.9.6 Estudio de aislamiento y cultivo de células PDL humanas con PRFC .**

Se encontró que el TGF- $\beta$ 1 combinado con PDGFBB e IGF-1 estimuló la mitogénesis y mejoró la adhesión de las células PDL a los fragmentos de raíz con enfermedad periodontal.

El tratamiento con ácido de raíz antes de la aplicación del factor de crecimiento mejoró la migración celular y la unión de nuevas fibras de colágeno a las ya existentes en cemento o dentina. La superficie acondicionada puede actuar como reservorio para la liberación del factor de crecimiento lento aumentando su vida media y consecuentemente favoreciendo la regeneración periodontal. Con la aplicación del factor de crecimiento se exhibieron un gran número de células unidas a las superficies de la raíz y extensiones citoplásmicas dirigidas a las células adyacentes.<sup>27</sup>

### 3.10. Andamios Nanofibrilares

Las estructuras nanofibrosas pueden ser fabricadas a partir de una variedad de materiales y métodos con diámetros que varían en toda la escala de tamaño donde las células pueden detectar fibras individuales.

Los andamios electrospun, que a menudo incorporan polímeros biológicos, compuestos o incluso precursores de cerámica, pueden proporcionar señales bioactivas.<sup>28</sup>

Un andamio ideal debería poseer características específicas de ECM naturales, en las cuales sea altamente poroso con poros interconectados y estructurados jerárquicamente. Los macroporos con tamaños en cientos de micrómetros mantendrían la estabilidad estructural del doblez, favorecen la proliferación celular, la eliminación de ECM y la formación de tejido; los poros medios con tamaños en decenas de micrómetros o menos facilitarían la difusión de nutrientes y promoverían la formación de vascularización, mientras que los poros pequeños con tamaños en micrómetros o menores tendrían un impacto en algunos comportamientos celulares tales como la siembra y la expresión génica.<sup>29</sup>

Existen diversos procedimientos para la fabricación de nanofibras tales como: auto-ensamblaje, separación de fases, electrospinning, celulosa bacteriana, templating, dibujo, extracción, polimerización en fase de vapor, síntesis de solución controlada cinéticamente y polimerización oxidativa química convencional de anilina<sup>30</sup>, de las cuales las más utilizadas son:

- El autoensamblaje, la mayoría de los andamios autoensamblados se preparan en soluciones, lo que resulta en propiedades mecánicas débiles.
- La separación de fases tiene poco control sobre el diámetro y la orientación de la fibra en un andamio, y el tiempo de preparación suele ser largo; además, este método solo puede generar poros relativamente pequeños con tamaños de hasta  $\approx 10\text{-}25\ \mu\text{m}$ . Aunque se puede combinar con la técnica de lixiviación porógena para producir los macroporos necesarios.
- El electrospinning ha atraído intereses crecientes debido a su capacidad para producir fibras con diámetros similares a los de las estructuras fibrosas en la matriz extra-

celular naturales (comúnmente conocidas como nanofibras electrospun), y el método se puede aplicar a una amplia gama de materiales. El área superficial específica grande de las nanofibras electrospuestas, así como la alta porosidad de las estructuras nanofibras electrohiladas, facilitarían y promoverían las funciones celulares (ejemplo; adhesión, proliferación, migración y diferenciación); adicionalmente, nanofibras electrospun puede funcionalizarse a través de la incorporación de especies bioactivas.<sup>29</sup>

### **3.11. Método de Hilado por Presión De Aire**

La técnica de hilado por propulsión de gas emerge como una alternativa altamente eficaz para la síntesis de andamios nanofibrilares de fácil acceso a los laboratorios por su bajo costo en comparación con el electrohilado que es una técnica costosa y riesgosa al trabajar con alto voltaje.

La técnica de hilado por propulsión de gas tiene como fundamento la aplicación de inyectar un gas inerte (argón o nitrógeno) y/o aire a presión (alrededor de 35 PSI) hacia un aerógrafo que contiene una solución de polímero disuelto en diferentes tipos de solventes (cloroformo, etanol, acetona, entre otros), para generar sobre un colector ya sea metálico o de plástico, andamios en tres dimensiones, los cuales pueden estar compuestos de fibras tanto en escalas micrométricas y nanométricas, dependiendo de la distancia que exista entre la punta del aerógrafo que contiene el polímero hacia la superficie del colector.

Las fibras que se logran sintetizar por esta técnica presentan diferentes tipos de propiedades fisicoquímicas que dependen del polímero que se utilice para su síntesis; sin embargo, tienen una alta área superficial que aumenta los contactos celulares, imita el tamaño de las fibras de colágena encontradas en la MEC y son materiales altamente porosos e interconectados que garantiza la repoblación celular.

Además, debido a que los solventes utilizados no degradan materiales biológicos abre la posibilidad de poder funcionalizar las membranas con factores de crecimiento o biomoléculas de interés biomédico.

### **3.12. Policaprolactona (PCL)**

Es un polímero hidrofóbico y semicristalino; su cristalinidad tiende a disminuir al aumentar el peso molecular. Sus características; cinética de degradación adaptable y propiedades mecánicas, facilidad de conformación y fabricación que permiten tamaños de poro apropiados que favorecen el crecimiento tisular y la administración controlada de fármacos contenidos en su matriz son ventajas que tiene sobre otros biopolímeros.

Debido al hecho de que PCL se degrada a un ritmo más lento que el poliglicólido (PGA), poli D, L-láctido (PDLA) y sus copolímeros, se utilizó originalmente en dispositivos de administración de fármacos que permanecen activos durante más de 1 año y en degradación lenta materiales de sutura.<sup>31</sup>

### **3.13. Regeneración Odontogénica con andamios nanofibrilares**

La regeneración odontogénica de las células madre de la pulpa dental (DPSCs) y PLA los andamios con nanofibras han demostrado que aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina, la expresión genética relacionada con la dentina y la mineralización. La mineralización de los andamios de nanofibras de PCL han demostrado promover la diferenciación odontogénica y el crecimiento de las células madres de la pulpa dental a través de colágeno tipo 1 y de una vía de señalización mediada por integrina, pero todavía carecen de propiedades mecánicas y biofuncionales para aplicaciones clínicas. Para aumentar las propiedades mecánicas y biológicas de las nanofibras de electrospun se incorporaron a partículas de vidrio activo, nanopartículas magnéticas y nanopartículas de hidroxiapatita a matrices de polímeros antes del electrospinning. Se han producido andamios con electrospun de nanopartículas bioactivas.

Se espera la regeneración periodontal, como consecuencia las membranas de la regeneración tisular guiada con nanofibras biodegradables a través de electrospinning mejore la funcionalidad, tal como la porosidad para unir células y la alineación de fibras para la orientación de fibras de colágeno en la regeneración del ligamento periodontal, como se investiga sobre la unión, proliferación y diferenciación de las células del liga-

mento. Se sugiere membranas de poliéster sintéticas biodegradables para la regeneración del ligamento periodontal.

Se han reelaborado una serie de nanofibras poliméricas que se utilizan como una plataforma celular para el hueso, pero carecen de bioactividad y otras biofuncionalidades para acelerar la regeneración del tejido óseo. Para ello se introdujo la mineralización artificial después de los aditivos de fabricación o carga, es decir nanopartículas bioactivas y factores de crecimiento, a los andamios durante el proceso de electrospinning y resultó en la inducción de la osteogénesis acelerando la mineralización natural o la vascularización. Estos andamios de nanofibras se emplearon como un portador de los factores de crecimiento asociados a los huesos debido a sus poros en red 3D para facilitar el control sobre la liberación de fármacos.<sup>32</sup>

# 4. JUSTIFICACIÓN

La periodontitis, es una enfermedad multifactorial causada principalmente por la colección de una biopelícula sobre la superficie de los órganos dentarios, caracterizada por la destrucción de los tejidos periodontales que soportan a éste órgano, lo que conlleva a la pérdida final del diente.

Se han desarrollado diversas estrategias para poder revertir los efectos indeseables de esta enfermedad, pero desafortunadamente los resultados obtenidos no han sido completamente satisfactorios y/o los esperados en el área de la periodoncia. Es por eso que la ingeniería de tejidos, que es una disciplina que intenta mediante la combinación de la ciencia de materiales, la potencialidad de las células troncales y la señalización de moléculas, devolver la función a los tejidos que conforman los órganos dentarios. Debido a esto, la síntesis y caracterización biológica de andamios que imiten las propiedades fisicoquímicas de la matriz extracelular nativa del órgano dentario cobra vital importancia en el área de las ciencias odontológicas.

Así este estudio pretende contribuir al desarrollo de membranas nanofibrilares por medio de la técnica de hilado por propulsión de gas a partir de un polímero como la policaprolactona que está aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) por sus propiedades de biocompatibilidad y de biodegradabilidad al combinarlo con un biopolímero rico en factores de crecimiento o PRFC que nos lleve a obtener una respuesta celular óptima en el campo de la periodoncia.

# 5. HIPÓTESIS

Los andamios nanofibrilares de PCL/PRFC sintetizados por el método de hilado por presión de aire, mejoran la respuesta de biocompatibilidad celular de las células derivadas de ligamento periodontal en comparación con las membranas nanofibrilares de PCL

# **6. OBJETIVOS**

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la respuesta de biocompatibilidad de las células derivadas de ligamento periodontal al ser cultivadas sobre andamios nanofibrilares de PCL y PCL/PRFC que imiten las propiedades de la matriz extracelular fibrilar nativa del ligamento periodontal.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Sintetizar por medio de la técnica de hilado por presión de aire, andamios poliméricos de PCL y PCL/PRFC.
2. Aislar células derivadas del ligamento periodontal.
3. Evaluar la adhesión celular sobre los andamios nanofibrilares de PCL y PCL/PRFC por medio del ensayo de cristal violeta.
4. Determinar la viabilidad celular sobre los andamios nanofibrilares de PCL y PCL/PRFC por medio del ensayo de MTT.

# **7. METODOLOGÍA**

## **7.1. Síntesis del andamio nanofibrilar de PCL y PCL/PRFC**

Los andamios de PCL serán sintetizados mediante la técnica de hilado por presión de aire, siguiendo los parámetros descritos a continuación: El PCL con un peso molecular de 70,000 a 90,000 adquirido de la compañía SIGMA, Aldrich, se disuelve en cloroformo a una concentración del 10% de peso/volumen y se deja en agitación durante toda la noche. Una vez obtenida la mezcla, esta se colocará en la cámara de fluido de un aerógrafo, conectado a un tanque de gas argón con una presión de salida del gas de 25 Psi y se deposita una membrana por un tiempo de 10 min sobre un sustrato de papel encerado que está a una distancia de 15 cm de la punta de eyección. Una vez depositada la mezcla polimérica, se dejará durante 24 h, con la finalidad de que se volatilice el solvente.

Para la síntesis del andamio de PCL/PRFC se sigue la misma metodología para preparar la solución solo que se adiciona el biopolímero (PRCF) dejándose en agitación durante toda la noche y la generación de las nanofibras siguió los mismos parámetros que las del PCL.

## **7.2. Selección de pacientes**

Para realizar este estudio, se reclutaron 2 pacientes sanos de sexo masculino de 12 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.

### **7.3. 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 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) frío para garantizar el estado celular del tejido pulpar.

### **7.4. Obtención del tejido de ligamento periodontal**

Posterior a la extracción del órgano dentario, se procedió a lavar varias veces el órgano dentario con medio alpha-MEM frío estéril con presencia de una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/mL), estreptomina (100 µg/mL), gentamicina (100 µg/mL) y fungisona (0.3 µg/mL) por 5 veces a 37°C bajo condiciones de cultivo 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad. Pasados los lavados se procedió a raspar del tercio medio hacia el ápice de la raíz del órgano dentario para obtener el tejido periodontal. Este tejido fue dispersado con tripsina durante 10 minutos y centrifugado a 5,000 rpm durante 5 min y sembrado en cajas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> en medio de cultivo alpha-MEM suplementado con 10% de SFB, una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/mL), estreptomina (100 µg/mL) y fungisona (0.3 µg/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.

## **7.5. Cultivo de fibroblastos derivados de ligamento periodontal (hPDL)**

La línea celular derivado del tejido periodontal se obtuvo a partir de las colonias celulares y fueron cultivadas en medio alpha-MEM suplementado con 10% de SFB, 4mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, y 100 µg/mL de gentamicina (todas las soluciones fueron obtenidas de Gibco BRL). Dicha línea celular fue utilizada para caracterizar la biocompatibilidad sobre los andamios hilados de PCL y PCL/PRFC. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> en un ambiente con 100% de humedad.

## **7.6. Obtención del plasma rico en factores de crecimiento (PRFC)**

Los pacientes voluntarios asignados para la extracción del PRFC de la clínica de alta especialidad, se citaron en el laboratorio en donde se realizó el protocolo de obtención de PRFC que se describe a continuación:

Se extrajeron 10 mL de sangre venosa recogidos en tubos de plástico revestido (Blood collecting tubes, Francia) que contiene 3.8% de citrato de sodio como anticoagulante (5 ml en cada uno). Los tubos se centrifugaron a 6.300 rpm durante 10 minutos usando la centrifuga de mesa Centrificiente a 4°C, para separar las diferentes fases de la sangre. Las fracciones de 0.5 mL situadas inmediatamente en la parte superior que es encima de la capa leucocítica se recogieron de cada tubo y se transfirieron a un tubo de 50 mL estéril. Con el fin de iniciar la coagulación y la activación de plaquetas para liberar los factores de crecimiento, se añadió el activador de PRFC que consta de 10% de cloruro de calcio (50 µL por mililitro), incubándose a 37°C durante 30 minutos hasta que se formó una capa gelatinosa de fácil manejo. Posteriormente el PRFC se sometió a congelación a -20°C y se llevó a liofilizar para poder realizar un polvo que será utilizado en la formación de las membranas de PCL/PRFC por la técnica de hilado por propulsión de gas.

## **7.7. Contenido de proteínas**

La concentración de proteína se evaluó mediante la absorbancia medición a 562 nm utilizando una proteína Micro BCA ensayo (PIERCE Corporation, Rockford, IL) y bovino albúmina sérica como curva estándar.

## **7.8. Gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida electroforesis (SDS-PAGE)**

Para la separación electroforética del PRFC se utilizó un gel de SDS-PAGE en gradiente de 4 al 12% de poliácridamida. Las alícuotas de PRFC se mezcla con 5% de una solución tampón de NUPAGE LDS (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) y se calentaron durante 10 minutos a 70°C para posteriormente ser cargados en los geles. La separación proteica se llevó a cabo a 200 V durante 35 minutos. Se utilizo un marcador de peso molecular estándar Novex Sharp Pre-Stained Protein Molecular Weight (Invitrogen). Pasado el tiempo se tiñen los geles con Azul de coomasie para revelar las bandas del los factores que conforman el PRFC.

## **7.9. Ensayo de Adhesión Celular**

Para establecer el efecto de los andamios hilados de PCL y PCL/PRFC sobre la adhesión celular, las células aisladas de hPDL fueron cultivadas sobre la superficie de los andamios de PCL y PCL/PRFC en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad celular de  $1 \times 10^5$  y se cultivarán durante 4 y 24 horas. Posterior al tiempo de sembrado; las células que no se adhieran a las superficies fueron removidas por medio de tres lavados con PBS (solución amortiguadora de fosfatos). Las células adheridas a las membranas fueron fijadas con 4% de paraformaldehído. La adherencia celular fue evaluada de acuerdo al método de Cristal Violeta. Brevemente, las células fijadas son 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 es extraído con 500µL de dodecilsulfato 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 es leído en un lector de placas a una absorbancia de 545nm. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre los andamios de PCL. Los experimentos de adhesión celular se realizarán por triplicado, repitiéndose por lo menos tres veces.

#### **7.10. Ensayo de Viabilidad Celular (Citotoxicidad)**

Para evaluar el efecto de los andamios hilados de PCL y PCL/PRFC sobre la viabilidad celular se llevó a cabo el ensayo de azul de triazol (MTT) basado en la habilidad de la enzima deshidrogenada mitocondrial para oxidar una sal de tetrazolio (3-[4,5-dimetiltiazol-2-y]-2-5 bromuro difeniltetrazolio) a un producto insoluble de color azul. Las células hPDL fueron cultivadas a una densidad celular de  $1 \times 10^5$  por triplicado por 3, 5, 7, Y 14 días de cultivo. Después de cada periodo experimental, las células fueron incubadas con MTT (50 mg/ml) a 37°C por 4 horas. Pasado este tiempo, el sobrenadante será removido y se les adicionaron 400µL de DMSO y la placa se llevó a un lector de ELISA, para obtenerse la densidad óptica a una longitud de onda de 545 nm. Debido a que la generación del producto azul es (directamente) proporcional a la actividad oxidativa de la enzima deshidrogenasa, una disminución en los valores que se obtengan en la absorbancia a 545 nm nos indicaría una medida de la viabilidad celular. Los experimentos se realizaron por triplicado repitiéndose tres veces.

#### **7.11. Análisis de resultados**

Los resultados serán analizados con pruebas de análisis de varianza t- student y ANOVA two-ways, para después realizar las gráficas comparativas en el programa GraphPad Prism para su análisis estadístico.

#### **7.12. Cronograma**

Noviembre 2016- Marzo 2017

Recopilación de muestras de PRFC en la clínica de Periodoncia e Implantología

Marzo - Septiembre 2017

Entrega de protocolo

Septiembre 2017- Febrero 2018

Síntesis de membranas

Cuantificación de proteínas

Electroforesis

Termino de protocolo

Marzo- Mayo 2018

Conteo celular

Ensayos

Lectura de muestras

Julio-Septiembre 2018

Escritura de Tesis

# **8. RESULTADOS**

## 8.1. Adhesión celular

Los resultados de la adhesión celular (4 y 24 hr) fueron analizados por el lector de ELISA (ChroMate) para medir la absorbancia del cristal violeta, dichos resultados demostraron un importante aumento de la adhesión celular en las membranas de PCL/PRFC en comparación del PCL a las 4 y 24 horas;  $p < 0.001$  (figura 1).

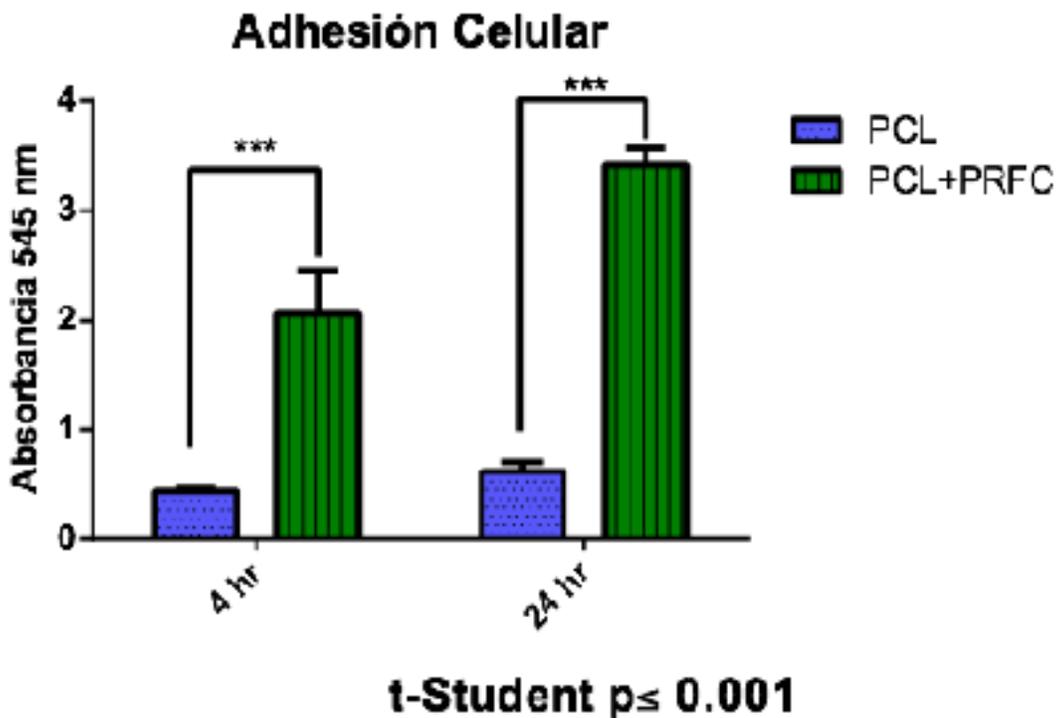


Figura 1. Gráfica de adhesión celular de las membranas de PCL y PCL/PRFC

## 8.2. Viabilidad celular

En la figura 2 se observan los datos de absorbancia para viabilidad celular (MTT), que muestran un aumento estadísticamente significativo en las membranas PCL-PRFC en los días 3, 5 y 14 con respecto a las membranas de PCL.

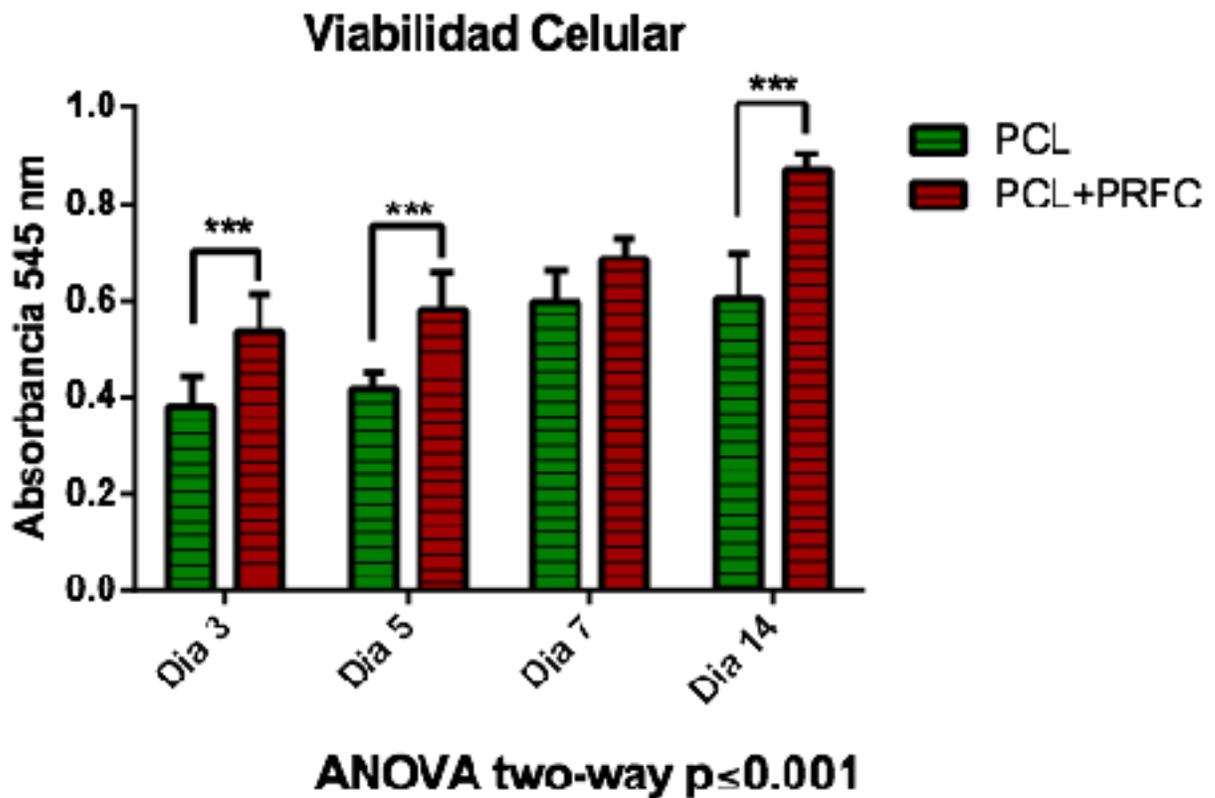
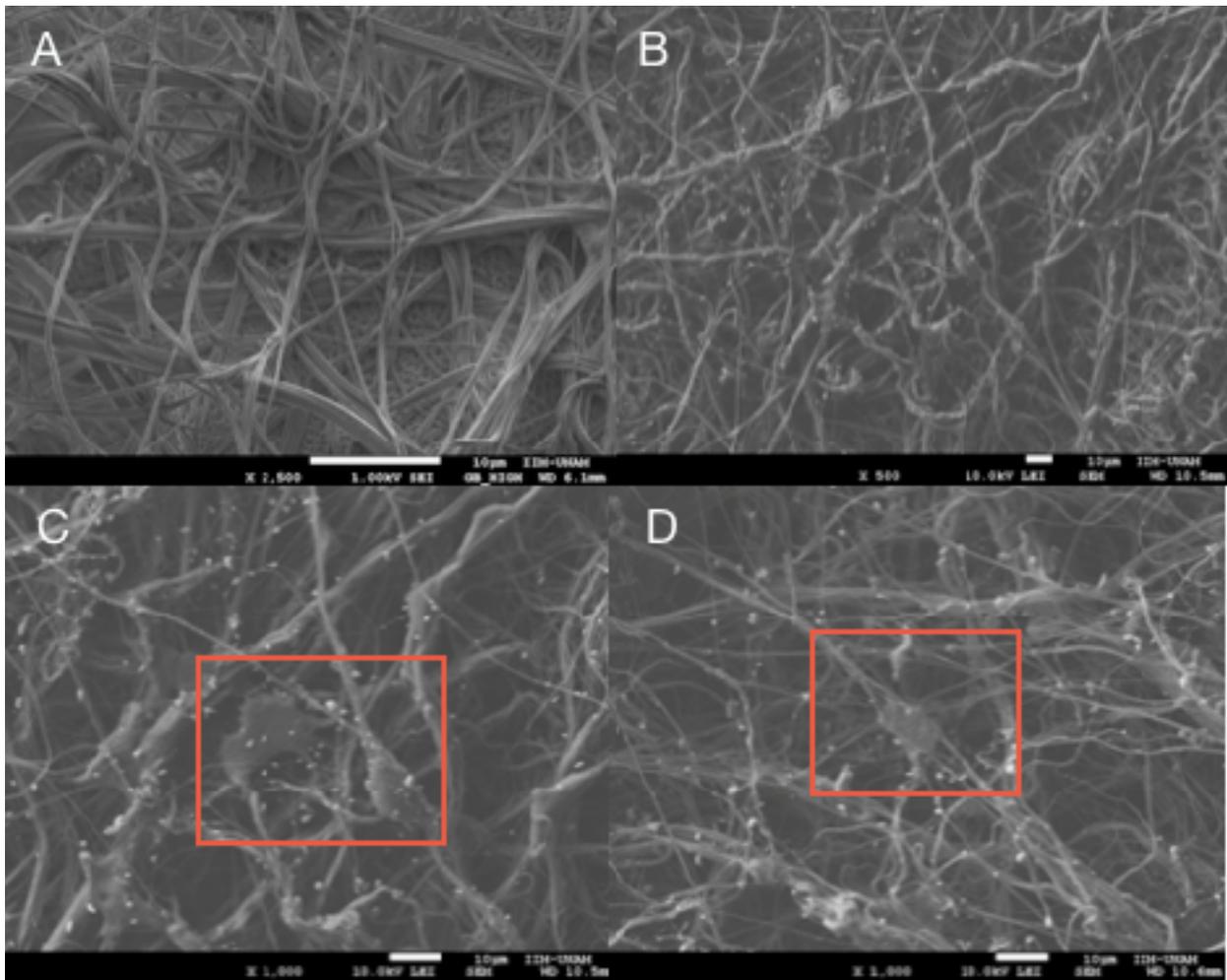


Figura 2. Gráfica de viabilidad celular de las membranas de PCL y PCL/PRFC

### 8.3. Microscopía electrónica de barrido MEB

Mediante el uso del microscopio electrónico de barrido de emisión de campo JEOL 7600F se obtuvieron micrográficas donde se observa la morfología a manera nanofibrilar de las membranas de PCL Figura 3 (A), En la figura 3 B se observa micropartículas adheridas a las fibras que se asume es el PRFC liofilizado; en la figura 3 (C-D) se observan células adheridas en las fibras de las membranas PCL-PRFC. (Recuadro rojo).



*Figura 3. Micrografías MEB A) PCL x2500 B)PCL/PRFC x500 C-D) Células adheridas a las membranas PCL/PRFC x1000*

# 9. DISCUSIÓN

La ingeniería de tejidos ha buscado la fabricación de andamios biocompatibles con polímeros que puedan generar señales bioactivas, <sup>23</sup> uno de esos polímeros ha sido el PCL que ha demostrado en otros estudios una elevada eficacia ya que, de acuerdo con su fabricación, permiten tamaños de poro apropiados que favorecen el crecimiento tisular. <sup>31</sup>

Tan P, y cols. (2007), en su estudio *Effect of stiffness of polycaprolactone (PCL) membrane on cell proliferation* realizaron pruebas donde se midió la rigidez de las membranas de PCL y demostraron que al emular el entorno nativo, es posible inducir una mejor proliferación celular. <sup>33</sup> Podemos contrastar con este estudio que el PCL promueve la adhesión y viabilidad celular al imitar la MEC, otro estudio realizado por Siqueira I, y cols., (2017) llamado *Porous membranes of the polycaprolactone (PCL) containing calcium silicate fibers for guided bone regeneration* realizó la producción y caracterización de membranas PCL / CaSiO<sub>3</sub> porosas mediante un método de humedad controlada. Donde fue posible observar una distribución homogénea de los poros y el tamaño de poro. También se mostró que la adición de CaSiO<sub>3</sub> no causó ningún cambio en la temperatura de fusión pero si se observó una disminución en el grado de cristalinidad, que al utilizarlos en los sistemas biológicos se ve favorecido para obtener una mejor adhesión celular; lo anterior indica que se puede añadir diversos biomateriales al PCL para mejorar sus características. <sup>34</sup>

Por otro lado se ha reportado el uso del PRFC donde, Anitua E (2012) y cols., en su publicación *Plasma Rich In Growth Factors Promote Gingival Tissue Regeneration by Stimulating Fibroblast Proliferation and Migration and by Blocking Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-Induced Myodifferentiation* realiza un análisis que mide el aumento en la proliferación, diferenciación, migración y adhesión celular, con el implemento del PRFC. Desarrollando cultivos primarios de fibroblastos gingivales humanos mediante el método explante. <sup>23</sup>

Taschieri S (2012) y cols., en su artículo *Impact of the use of plasma rich in growth factors (PRGF) on the quality of life of patients treated with endodontic surgery when a perforation of sinus membrane occurred* elaboraron un análisis en pacientes a los que se les produjo una perforación de la membrana de Schneider durante una cirugía endodóntica, usando de plasma rico en factores de crecimiento (PRFC) donde se

comparó con un grupo control obteniendo el PRFC un papel principal en la reducción significativa de los síntomas más comunes como el dolor y la inflamación. <sup>26</sup>

Estos resultados demostraron que los factores de crecimiento contribuyen a los procesos de regeneración de tejidos como son; estimulación de la división celular, migración, adhesión celular, diferenciación y expresión genética. <sup>23</sup>

De igual forma se observa que los factores de crecimiento incrementan la adhesión y viabilidad celular en crecientes rangos de tiempo, lo cual nos indica que existe una amplia liberación de proteínas biológicamente activas. <sup>20</sup>

Contrastando los estudios anteriores con los resultados obtenidos en las membranas de PCL y PCL/PRFC es que tanto el PCL como PRFC tienen efectos biológicos favorables, y que al estar unidos en una membrana tienen como resultado un aumento en las propiedades de adhesión y viabilidad celular.

# **10. CONCLUSIONES**

- El método de hilado por presión de aire permitió obtener membranas de estructura nanofibrilar de PCL, además de permitir la adición de PRFC.
- El método hilado no modifica la estructura química del PCL.
- La membrana PCL/PRFC mejoran la adhesión y viabilidad celular en comparación con la membrana de PCL.
- Se comprobó la biocompatibilidad y capacidad de las membranas para imitar las propiedades de la matriz extracelular fibrilar nativa del ligamento periodontal.

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1 [Internet]. Gob.mx. 2018 Available from: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/212323/SIVEPAB-2015.pdf>

2 Carranza F, Newman M, Takei H, Klokkevold P. Periodontología clínica. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.

3 Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold P, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *Journal of Cellular Physiology*. 2009;219(3):667-676.

4 Ross H, Wojciech P. Histología, Texto atlas color con biología Celular y molecular. 6ta edición: Argentina; 2012.

5 Marsell R, Einhorn T. The biology of fracture healing. *Injury*, 2012;(1):1-9.

6 Lindhe J, Karring T, Lang N. Periodontología clínica e implantología odontológica. 6th ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2016.

7 Rose L. Periodontics. 1st ed. St. Louis, Mo.: Mosby; 2004.

8 Anitua E, Andia I. Un nuevo enfoque en la regeneración ósea. Plasma rico en factores de crecimiento. 1era edición. España: Puesta al día publicaciones S.L: 2000.

9 Sánchez M, Andia I, Anitua E, Sánchez P. Platelet Rich Plasma (PRP) Biotechnology: Concepts and Therapeutic Applications in Orthopedics and Sports Medicine. Intechopen, 2012; 114-138.

10 Papapanou P, Tonetti M. Diagnosis and epidemiology of periodontal osseous lesions. *Periodontology* 2000. 2000;22(1):8-21.

- 11 Hsu Y, Wang H. How to Select Replacement Grafts for Various Periodontal and Implant Indications. *Clinical Advances in Periodontics*, 2013;3(3):167-179.
- 12 G S. Stem Cell Scaffolds for Tissue Engineering. *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences*. 2017;9(1).
- 13 Scheller E, Hrebsbac P, Kohn DE. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *J Oral Rehabil*. 2010;1:1-31.
- 14 Yılmaz S, Cakar G, Dirikan S, Platelet Rich Plasma in Reconstructive Periodontal Therapy. *Intechopen*. 2011;269-290.
- 15 Sell S, Wolfe P, Ericksen J, Simpson D, Bowlin G. Incorporating Platelet-Rich Plasma into Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Application. *Tissue engineering, Part A*. 2011;17(21); 2723-2737.
- 16 Anitua E, Orive G, Pla R, Roman P, Serrano V, Andia I. The effects of PRGF on bone regeneration and on titanium implant osseointegration in goats: A histologic and histomorphometric study. *J Biomedical Materials Research Part A*. 2009;158-165.
- 17 Eskan M, Greenwell H. Theoretical and Clinical Considerations for Autologous Blood Preparations: Platelet-Rich Plasma, Fibrin Sealants, and Plasma-Rich Growth Factors. *Clinical Advances in Periodontics*. 2011;1(2):142-153.
- 18 Cole B, Seroyer S, Bajaj S, Filardo G, Platelet-Rich Plasma: Where Are We Now and Where Are We Going?. *Soportas healing*. 2010;2(3)203-210.
- 19 He X, Chen W, Ban G, Wei W, Zhou J, Chen W et al. A New Method to Develop Human Dental Pulp Cells and Platelet-rich Fibrin Complex. *Journal of Endodontics*. 2016;42(11):1633-1640.

20 Fernández R, López M, Ruiz E. Plasma rico en factores de crecimiento en cirugía bucal. Presentación de caso clínico. Revista Odontológica Mexicana. 2005;9(3): 141-146.

21 E Murakami, Anexo al tema 3 Factores de crecimiento; 2007

22 Anitua E, Flores J, Hamdan M. Transcrestal Sinus Augmentation by Sequential Drilling and the use Plasma Rich in Growth Factors. International Journal of Oral and Maxillofacial implants. 2016:1-7. 42

23 Anitua E, Troya M, Orive G. Plasma Rich In Growth Factors Promote Gingival Tissue Regeneration by Stimulating Fibroblast Proliferation and Migration and by Blocking Transforming Growth Factor- $\beta$ 1-Induced Myodifferentiation. Journal of Periodontology. 2012;83(8):1028-1037.

24 Sánchez-Gutiérrez C, Cepeda-Bravo J, Fierro-Serna V, García-García C, Martínez-Rider R, Noyola-Frías M. Eficacia del uso del plasma rico en factores de crecimiento en defectos periodontales distales de segundos molares inferiores, posterior a la extracción de un tercer molar mandibular. Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial. 2017;39(3):164-170.

25 Kämmerer P, Schiegnitz E, Palarie V, Dau M, Frerich B, Al-Nawas B. Influence of platelet-derived growth factor on osseous remodeling properties of a variable-thread tapered dental implant in vivo. Clinical Oral Implants Research. 2016;28(2):201-206.

26 Taschieri S, Corbella S, Tsesis I, Del Fabbro M. Impact of the use of plasma rich in growth factors (PRGF) on the quality of life of patients treated with endodontic surgery when a perforation of sinus membrane occurred. Oral and Maxillofacial Surgery. 2013;18(1):43-52.

- 27 Sant'Ana A, Marques M, Barroso E, Passanezi E, de Rezende M. Effects of TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB, and IGF-1 on the Rate of Proliferation and Adhesion of a Periodontal Ligament Cell Lineage In Vitro. *Journal of Periodontology*. 2007;78(10):2007-2017.
- 28 Nisbet D, Forsythe J, Shen W, Finkelstein D, Horne M. Review Paper: A Review of the Cellular Response on Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering. *Journal of Biomaterials Applications*. 2008;24(1):7-29.
- 29 Xu T, Miszuk J, Zhao Y, Sun H, Fong H. Bone Tissue Engineering: Electrospun Polycaprolactone 3D Nanofibrous Scaffold with Interconnected and Hierarchically Structured Pores for Bone Tissue Engineering (*Adv. Healthcare Mater.* 15/2015). *Advanced Healthcare Materials*. 2015;4(15):2237-2237.
- 30 Beachley V, Wen X. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Prog Polym Sci*. 2010;35(7):868–892.
- 31 Woodruff M, Hutmacher D. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*. 2010;35(10):1217-1256.
- 32 Seo S, Kim H, Lee J. Electrospun Nanofibers Applications in Dentistry. *Journal of Nanomaterials*. 2016;2016:1-7.
- 33 Tan P, Teoh S. Effect of stiffness of polycaprolactone (PCL) membrane on cell proliferation. *Materials Science and Engineering: C*. 2007;27(2):304-308.
- 34 Siqueira I, de Moura N, de Barros Machado J, Backes E, Roberto Passador F, de Sousa Trichês E. Porous membranes of the polycaprolactone (PCL) containing calcium silicate fibers for guided bone regeneration. *Materials Letters*. 2017;206:210-213.
- 35 Shoja M. Preparation And Characterization Of Poly (E- Caprolactone)/Tio<sub>2</sub> Micro-Composites. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2015;10(2):471 - 477.

# **ANEXOS**

## Espectro IR de PCL y PCL/PRFC

Se estudio la absorción de grupos funcionales de materiales orgánicos en el PCL y PCL/PRFC por medio del espectrofotómetro de infrarrojo por reflectancia total atenuada (ATR). El espectro fue recolectado en el rango de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas de absorción características de PCL (negro) se muestran en comparación con las bandas de PCL/PRFC (rojo) en la figura 4.

Las bandas de absorción características a 2942 y 2865  $\text{cm}^{-1}$  están relacionadas con la vibración de estiramiento C-H. la banda a 1721  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a la vibración de estiramiento de los grupos carbonilo (C = O) y las bandas de absorción características en el rango de 1165-1468  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a la deformación de  $-\text{CH}_2-$ .<sup>35</sup>

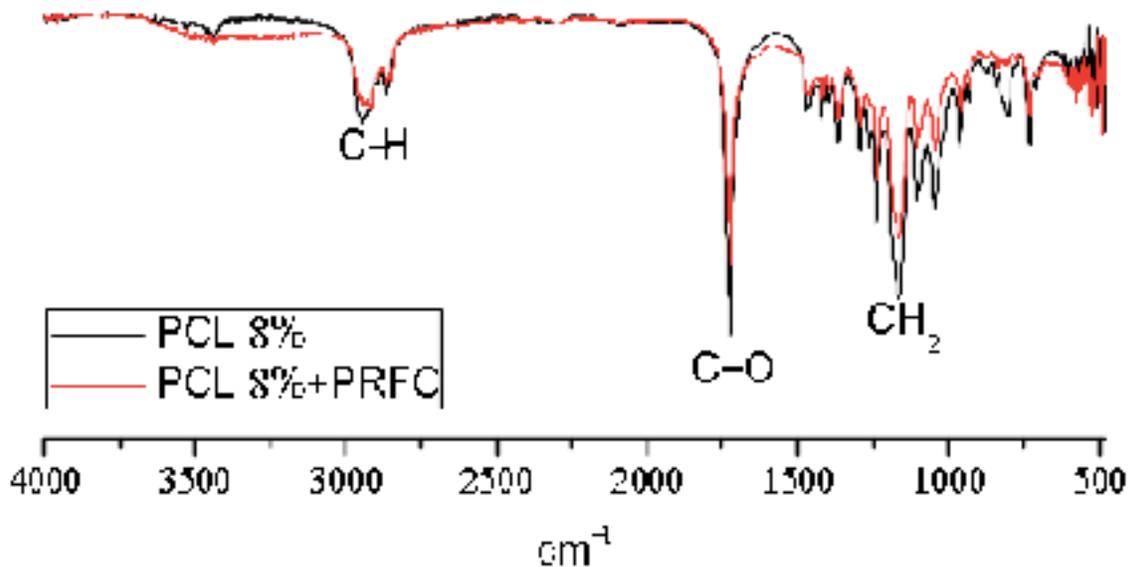


Figura 4. Espectro IR de PCL y PCL/PRFC al 8 %

Número de onda $\text{cm}^{-1}$	Asignación de banda
2942 y 2865	Estiramiento C-H
1721	C = O
1165-1468	Deformación de -CH <sub>2</sub>

*Tabla 1. Asignación de bandas de espectros IR a PCL.*

Las membranas de PCL/PRFC muestran las mismas bandas características de el polímero de PCL debido al mayor porcentaje de concentración de dicho polímero.

### Gel de SDS-Page

Uno de los métodos de electroforesis más comúnmente aplicado para conocer el peso molecular de las proteínas es el que emplea geles de poliacrilamida (PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis) en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). Esta técnica nos permitió observar el patrón de bandeo característico de las proteínas que conforman a la mezcla del PRFC.

