



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza
Carrera de Cirujano Dentista



**EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE ANDAMIOS
NANOFIBRILARES DE PLA ESTERILIZADOS POR
DIFERENTES TÉCNICAS Y SU RESPUESTA
INFLAMATORIA EN RATAS *WISTAR***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A

MENDIETA BARRAÑÓN ISARAI

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Janeth Serrano Bello

ASESORAS

CD. EOPB. María del Carmen Salazar Vera

MTRA. María del Socorro Álvarez Martínez

México, Cd. Mx., 2017



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.

DEDICATORIAS

Quiero dedicar este trabajo a mis padres José R. Mendieta Zaragoza y Beatriz J. Barrañón Cruz, quienes sin pensarlo han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme, gracias por todo su amor, fortaleza y apoyo que me ha servido de guía a lo largo de este camino. No tengo palabras para agradecer todo lo que han hecho por mí.

A mi hermana Zaira porque es como una luz en un túnel oscuro, gracias por enseñarme tanto y porque siempre has estado a mi lado, tu felicidad nos contagia a todos, a mi hermano Saul por ser tan noble y atento, tu gran corazón me llena el alma y a mi hermana Gabriela por aceptar ser parte de esta familia.

A David, por todo el apoyo y cariño que me has brindado, por enseñarme y dejarme aprender, por tu entrega y pasión, por ser mi amigo, compañero y pareja. Gracias por las alegrías compartidas cada día, siempre sabes cómo hacerme sonreír.

A todos los miembros mi familia porque de alguna manera siempre están ahí, gracias por todo su amor y apoyo, con todos crecí y viví grandes momentos, fueron parte de mi formación y son parte de mi presente.

A todos mis amigos que he tenido la fortuna de encontrar en el camino, han hecho de todo este proceso algo más sencillo, los pasatiempos a su lado siempre son fugaces y felices.

A mis entrenadores, en especial a Yuridia Cruz y Jair Juárez, quienes fueron una pieza fundamental en mi educación, porque sus enseñanzas van más allá de una

cancha de fútbol, los valores que aprendí los llevo presentes para poder seguir adelante.

A mis amigas y compañeras del equipo representativo de fútbol femenino de la UNAM, con quienes conviví gran parte de mi vida, pues con ellas entendí entre muchos otros valores, la importancia de la constancia, compromiso, el trabajo en equipo, la competencia, y sobre todo, la amistad. Gracias por ser parte de esto.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Janeth Serrano Bello por ser una gran persona y profesora, gracias por ser una fuente de inspiración, por sus conocimientos compartidos, su paciencia y guía para el desarrollo de este proyecto, su dedicación y pasión en esta área se nota y contagia, gracias por ser una persona entregada y apasionada, su aporte como docente es de admirar.

A la Dra. María del Carmen Salazar Vera a quién le estoy agradecida por darme la oportunidad de trabajar a su lado, sus conocimientos y guía me han servido no solo para este proyecto, a lo largo de la carrera me ha dejado aprendizajes que duran para toda la vida.

A la Dra. María del Socorro Álvarez Martínez por su apoyo como persona y docente, sus conocimientos y entusiasmo me llenan de anhelos que seguro pronto realizaré.

A todos los profesores y doctores que me dieron herramientas para continuar, gracias por sus diferentes formas de enseñar, me incentivaron en muchos sentidos a seguir adelante en este camino.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la DEPel de la UNAM, en especial al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez quien siempre estuvo abierto a solucionar dudas y guiarme durante este proceso, a Vladimir y Osmar por sus consejos y apoyo para este proyecto.

Al Instituto de Física de la UNAM, en especial al Dr. Luis Alberto Medina Velázquez y al M. en C. Manuel Aguilar Franco.

Al Departamento de Patología y Medicina Bucal de la DEPel de la FO, UNAM, por todo el apoyo y asesoramiento requerido para este proyecto.

A la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM, en particular al Dr. Enrique Pinzón Estrada, jefe de la misma, por su apoyo técnico en el cuidado y manejo de los animales de laboratorio, así como al M.V.Z. Ismael Torres Saldaña, al M.V.Z. Victor Manuel Salgado Alfaro y a la Unidad de Bioterio de la DEPel de la FO UNAM, al Sr. Juan Manuel Trejo Ramírez.

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater, en especial a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por permitirme desarrollarme en una gran y noble profesión como lo es en la Carrera de Cirujano Dentista, gracias por todos los conocimientos y experiencias adquiridas.

Índice

Índice de Tablas	6
Índice de Figuras	6
Resumen	8
Summary	9
1. Introducción	11
2. Marco Teórico	12
3. Planteamiento del Problema	23
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	24
5.2. Objetivo general	24
5.3. Objetivos específicos	24
6. Material y Método	25
6.1. Clasificación del Tipo de Estudio	25
6.2. Universo de Estudio	25
6.3. Muestra	25
6.4. Material	26
6.5. Método	28
6.6. Variables	34
6.7. Diseño estadístico	34
7. Resultados	35
8. Discusión	49
9. Conclusiones	52
10. Referencias Bibliográficas	53
11. Anexos	65
Glosario	67

Índice de Tablas

Tabla 1. Lista de los recursos físicos, humanos, animales y financieros.	27
Tabla 2. División de grupos de PLA de manera aleatoria, señalización de días de evaluación, inyección del fármaco radiactivo y/o sacrificio animal	33
Tabla 3. Clasificación de las variables dependientes e independientes	34

Índice de Figuras

Figura 1. Esquemas simplificados de modos comunes de análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	19
Figura 2. Espectro FTIR de andamios electrohilados de PLA, PLA/PBS (90/10), PLA/PBS (80/20), PLA/PBS (60/40), PLA/PBS (40/60) y PBS.....	20
Figura 3. Esquema de la utilización de AJS.	28
Figura 4. Fotomicrografía obtenida del MEB mostrando la contabilidad de fibras de andamios de PLA al 7%. Fuente: Elaboración propia.	30
Figura 5. Fotomicrografías de andamios de PLA al 7% a 500x y 2000x (A y B) Control (C y D) esterilizados por Radiación gamma.....	35
Figura 6. Fotomicrografías de andamios de PLA al 7% a 500x y 2000x (E y F) esterilizados por óxido de etileno (G y H) esterilizados por H ₂ O ₂	36
Figura 7. Número de fibras y diámetro del andamio control.	37
Figura 8. Número de fibras y diámetro del andamio esterilizado con R γ	38
Figura 9. Número de fibras y diámetro del andamio esterilizado con OE.	38
Figura 10. Número de fibras y diámetro del andamio esterilizado con H ₂ O ₂ . La curva promedio da en 0.6 μ	39
Figura 11. Espectro FTIR del andamio nanofibrilar control de PLA. Fuente: Elaboración propia.	40

Figura 12. Espectro FTIR del andamio nanofibrilar de PLA esterilizado con radiación gamma. Fuente: Elaboración propia.	41
Figura 13. Espectro FTIR del andamio nanofibrilar de PLA esterilizado con óxido de etileno. Fuente: Elaboración propia.....	41
Figura 14. Espectro FTIR del andamio nanofibrilar de PLA esterilizado con plasma (H ₂ O ₂). Fuente: Elaboración propia.....	42
Figura 15. Espectros FTIR de los andamios nanofibrilares de PLA esterilizado con las diferentes técnicas. Fuente: Elaboración propia.	42
Figura 16. a) Ubicación de los andamios en el lomo de la rata. Imágenes fusionadas de μ SPECT-CT a diferentes tiempos. Fuente: Elaboración propia.	43
Figura 17. Fotomicrografías de cortes histológicos teñidas con H y E correspondientes a los 4 días posteriores a la implantación de andamios de PLA al 7%	45
Figura 18. Fotomicrografías correspondientes a los 10 días post implantación de los andamios de PLA al 7%.....	46
Figura 19. Fotomicrografías correspondientes a los 21 días de evaluación de los andamios de PLA al 7%.	48

Resumen

En los últimos años, la bioingeniería de tejidos ha evolucionado de manera considerable, debido a las incógnitas en el área de la medicina y disciplinas relacionadas, estudiando los materiales para la sustitución o regeneración de órganos o tejidos que han sido dañados o perdidos. Actualmente, se ha trabajado en la síntesis y caracterización físico-química de andamios de poliácido láctico, material que se ha comprobado que es biocompatible y biodegradable. Por ello, es de suma importancia realizar estudios sobre los métodos de esterilización de las muestras, ya que se pretende hacer medicina traslacional en animales de experimentación. Por tal motivo, es importante determinar cuál es la mejor técnica de esterilización, con la cual no se daña ni modifica la estructura y composición de dichos andamios de PLA al 7%.

En el presente estudio, las técnicas de esterilización empleadas fueron, radiación gamma, óxido de etileno y peróxido de hidrógeno. Se evaluó la estructura superficial de los andamios antes y después de ser esterilizados, por medio de Microscopia Electrónica de Barrido, Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier y de manera *In vivo* se evaluó la respuesta histológica que provocaron dichos andamios (esterilizados por diferentes técnicas y uno sin esterilizar como control) en tejido celular subcutáneo de ratas macho cepa *Wistar* a diferentes periodos de tiempo, 4, 10 y 21 días, así como la evaluación de grado inflamatorio de los andamios de PLA al 7% por medio de μ SPECT/CT con Galio 67 (Ga^{67} .)

Después de ser analizados los andamios de PLA al 7%, se demostró que la técnica de esterilización por medio de plasma, es una alternativa útil en la ingeniería de

tejidos para lograr la traslación de nanomateriales poliméricos con futuras aplicaciones en la medicina regenerativa, ya que no modificó considerablemente la estructura superficial de las fibras del PLA y su respuesta *in vivo* no causó reacción tisular desfavorable.

Summary

In recent years, tissue bioengineering has evolved considerably, due to unknowns in the area of medicine and related disciplines, studying materials for the replacement or regeneration of organs or tissues that have been damaged or lost. Currently, work has been done on the synthesis and physical-chemical characterization of scaffolds of polyacid lactic material, which has been found to be biocompatible and biodegradable. For this reason, it is very important to carry out studies on the methods of sterilization of the samples, since it is intended to perform translational medicine in experimental animals. For this reason, it is important to determine the best sterilization technique, which does not damage or modify the structure and composition of such 7% PLA scaffolds.

In this research, the sterilization techniques used were gamma radiation, ethylene oxide and hydrogen peroxide. The surface structure of scaffolds before and after sterilization was evaluated by means of Scanning Electron Microscopy, Fourier Transform Infrared Spectroscopy and *in vivo* the histological response of the scaffolds (sterilized by different techniques and one Without sterilizing as a control) in subcutaneous cell tissue of male *Wistar* rats at different time periods, 4, 10 and 21 days, as well as the evaluation of inflammatory grade of 7% PLA scaffolds by mean of μ SPECT / CT with Gallium 67 (Ga^{67} .)

After the 7% PLA scaffolds were analyzed, it was demonstrated that the technique of plasma sterilization is a useful alternative in tissue engineering to achieve the transfer of polymer nanomaterials with future applications in regenerative medicine, because don't significantly modify the surface structure of PLA fibers and their response *in vivo* didn't cause unfavorable tissue reaction.

1. Introducción

La odontología actual exige avanzar en el estudio de materiales que puedan ser útiles para la regeneración o sustitución de tejidos u órganos dañados o perdidos, por alguna enfermedad, trauma o de manera congénita, es por ello que en el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM, se están caracterizando de manera física, química y biológica el comportamiento de diferentes materiales, los cuales serán empleados en tratamientos para defectos óseos de tamaño crítico, con el fin de evaluar su potencial de regeneración, por lo cual es muy importante establecer una técnica de esterilización terminal que garantice que no haya daño en la estructura y composición de la muestra, así como irritación en los tejidos.

En el presente estudio se identificó la mejor técnica de esterilización para los andamios poliméricos de Poliláctico (PLA), empleando los métodos de esterilización por radiación gamma (γ), óxido de etileno (OE) y plasma (H_2O_2). Se evaluó: la estructura superficial de PLA por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), la composición química de los andamios por medio de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) y la respuesta inflamatoria mediante imagen molecular con galio 67 (Ga^{67}). Finalmente a través del microscopio óptico se observó la respuesta histológica que presentaron ratas macho cepa *Wistar* en tejido subdermico a 4, 10 y 21 días, teñidos con hematoxilina y eosina (HyE).

2. Marco Teórico

La Bioingeniería de Tejidos es una disciplina reciente, que asocia la biología celular y la ingeniería de materiales biocompatibles^[1], es un campo que está en crecimiento^[2] y busca la combinación de andamios, células y moléculas biológicamente activas^[3-6], con la finalidad de desarrollar sustitutos biológicos que permitan reestablecer o mantener la función normal de un órgano o tejido^[2,4,7-11]. Su aplicación en el campo de la medicina abre nuevas alternativas de tratamiento para pacientes con diferentes tipos de patologías^[12-14] o aquellos que requieren cirugía reconstructiva, entre otros^[15].

Los materiales dentales han ido evolucionando de manera rápida gracias a los adelantos tecnológicos, los cuales han ayudado para que estos materiales tengan mejores propiedades físicas, químicas y biológicas^[16], en el área odontológica se emplean andamios en defectos de cabeza y cuello, dando énfasis en defectos óseos ya sea por enfermedad periodontal o por alguna enfermedad adquirida o congénita.

En relación con los biomateriales, estos pueden ser susceptibles a ser utilizados como andamios o subestructuras porosas que permitan la integración de un tejido tridimensional similar a la estructura anatómica propia del tejido que requiere regenerarse, el andamio debe realizar una serie de funciones críticas, primero debe proporcionar una red de poros abiertos para la distribución celular uniforme el cultivo celular, así como para el transporte de moléculas, señalización, nutrientes, y la eliminación de desechos metabólicos. Por último los andamios deben proporcionar una plantilla tridimensional que guíe el crecimiento del tejido a regenerar^[17], dichos andamios deberán estar compuestos por una matriz biocompatible y

biodegradable^[2,6], “siendo capaces de alojar y permitir el crecimiento, la reproducción y la renovación de las células incluidas en su matriz y a la vez ser susceptibles de ser eliminados por el metabolismo propio del tejido hospedero”^[12].

Los materiales utilizados para implantes e interacción directa con tejido biológico deben cumplir con propiedades de biocompatibilidad, es decir, propiedades biológicas, físicas, químicas y mecánicas aptas para procesos de locomoción y adhesión celular, con baja toxicidad, proliferación celular, estabilidad a la degradación y un adecuado comportamiento térmico, además, las propiedades mecánicas de los andamios deben ser suficientes y no colapsar durante la manipulación en actividades normales del paciente^[18,19].

Hoy en día, entre los materiales más utilizados para fabricar andamios, se encuentran los poliméricos sintéticos y naturales, los primeros pueden ser producidos bajo condiciones controladas y por lo tanto sus propiedades mecánicas pueden ser predecibles, reproducibles o modificables, las pruebas más utilizadas son, resistencia a la tracción y módulo elástico^[18]. Para la fabricación de andamios, se deben considerar varios aspectos que son fundamentales, estos deben poseer geometrías que permitan direccionar la regeneración tisular o la generación de un nuevo tejido^[20]. Uno de los polímeros sintéticos más utilizados a nivel biomédico es el poliácido láctico (PLA). Éste polímero sintético es un excelente candidato para hueso y cartílago debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad, así como la facilidad de la fabricación^[18,21–23].

Como se mencionó anteriormente, los andamios necesitan ser biocompatibles y biodegradables, además de que al momento de colocarlo en el tejido receptor debe

estar completamente estéril, para no dañar el tejido con algún agente patógeno^[18,24,25], así garantizar el éxito del biomaterial.

Algunas de las formas con las que se pueden esterilizar los biomateriales son:

Radiación Gamma

La radiación es la propagación de energía, ya sea mediante ondas electromagnéticas o de partículas subatómicas, a través de un medio material o bien, vacío. La radiación se clasifica en ionizante y no ionizante, la primera, tiene capacidad esterilizante, la segunda, solo tiene capacidad desinfectante. La radiación ionizante al interactuar con la materia produce la ionización de la misma, es decir, origina partículas con carga eléctrica (iones). El origen de estas radiaciones siempre es atómico, produciendo tanto en el núcleo como en sus órbitas, cargas electromagnéticas^[26]. La dosis de ionización de 25 kGy y una máxima temperatura de 30-40°C^[27,28], generalmente de una fuente de Cobalto 60 (Co⁶⁰)^[26-32], es un proceso establecido a gran escala que es simple y altamente efectivo para la esterilización de dispositivos médicos farmacéuticos, tejidos y materiales termosensibles, a esto se le denomina, esterilización en frío o radio esterilización^[26,27]. La radiación gamma es la forma más comúnmente empleada para la esterilización de alta penetración, se ha demostrado que puede destruir ácidos nucleicos. Esta tecnología presenta una serie de ventajas sobre el óxido de etileno incluyendo que su alta penetración elimina residuos químicos, lo que aumenta la seguridad de los productos^[33].

La radiación gamma provoca la escisión de cadena del PLA, disminuye el peso molecular y afecta adversamente las propiedades mecánicas del polímero^[34–36]. El proceso de escisión de cadena ocurre debido a la formación de radicales libres^[37]. Estos radicales libres pueden romper las cadenas poliméricas, y pueden dar lugar al deterioro de las propiedades mecánicas del polímero. Dependiendo de la dosis de radiación y de la estructura química de los polímeros, la radiación gamma puede también provocar la reticulación de las cadenas poliméricas, lo que generalmente da lugar a una resistencia a la tracción aumentada^[38].

Óxido de Etileno

El Óxido de Etileno (OE) es un producto que resulta de la oxidación del etileno (eteno). Su fórmula empírica es C_2H_4O . Es un gas incoloro a temperatura ambiente y presión normal, y un líquido incoloro por debajo de su punto de ebullición (10,5 °C con un rango entre 10,4°C-10,7°C). En forma de gas, su olor es perceptible a partir de concentraciones de 700 ppm, es soluble en disolventes orgánicos y se puede mezclar fácilmente con agua a cualquier proporción formando el etilenglicol (bajo ciertas condiciones). Es muy inflamable en forma de gas, su punto de autoignición en presencia de oxígeno es de 429 °C y en el vacío es de 571°C^[39]. La esterilización con OE es un proceso de baja temperatura ampliamente utilizado para la esterilización de dispositivos termosensibles (temperaturas menores de 60 °C), como plástico, polietileno, catéteres y sondas reutilizables, endoscopios rígidos termosensibles, sistemas ópticos, cables de luz de endoscopios y motores neumáticos termosensibles. Aunque presenta efecto bactericida, esporicida y

virucida, también tiene desventajas como su toxicidad, cambios en la morfología de los materiales, subproductos y residuos de gas^[33,34,40,41] necesitando un tiempo específico (generalmente largo) de aireación del material.

La manera por la cual se esterilizan los materiales por esta técnica es con 100% de óxido de etileno con una humedad entre el 40% y 70%, a presión negativa, siguiendo un ciclo frío (37 °C) durante 5 horas y un ciclo caliente (55 °C) durante dos horas. Finalmente las muestras deben de ser aireadas durante un tiempo establecido, generalmente 12 horas para eliminar el gas retenido. La aireación es muy importante ya que libera el gas retenido, sin embargo su eficacia influye dependiendo de las características de los materiales como su composición química, grosor, estructura, etc., además de la distribución y colocación de la carga en la cámara de aireación y renovaciones de aire por horas^[11,27,30,39,40,42–49].

Plasma (H₂O₂)

El gas plasma de esterilización de peróxido de hidrógeno a baja temperatura se ha aplicado a nivel hospitalario por casi una década, es seguro para el medio ambiente y también es menos peligroso trabajar con él. Es una de las tecnologías modernas para esterilizar el material termosensible, que consiste en ionizar el peróxido de hidrógeno para convertirlo en gas plasma; éste a la vez se descompone en vapor de agua y en oxígeno como producto final. A diferencia del óxido de etileno el peróxido de hidrógeno no es tóxico y no deja residuos significativos en las muestras esterilizadas. La esterilización por este medio no excede de 50 °C con un ciclo entre 45-70 min. En este sistema de esterilización, el peróxido de hidrógeno líquido se inyecta en la cámara al vacío, después de la difusión, una onda de

radiofrecuencia hace que el peróxido de hidrógeno se separe en radicales hidroxilo e hidroperoxi; esto se llama **gas plasma**. No es necesaria la ventilación, en una hora, aproximadamente, pueden ser utilizados y es apropiado para la esterilización de los materiales que son termosensibles. El peróxido de hidrógeno destruye de manera eficaz la mayor parte de las bacterias; asimismo, en concentraciones más altas (10-25%) provoca la destrucción de todos los microorganismos, incluidas las esporas. La forma oxidante activa no es el peróxido de hidrógeno, sino el radical hidroxilo libre formado tras su descomposición [\[17,30,46,47,50\]](#).

TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE ANDAMIOS

Evaluación de la estructura superficial de los andamios con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

En el Microscopio Electrónico de Barrido, el haz de electrones no atraviesa la muestra, sino que se explora (barre) su superficie. Es un método ampliamente usado en biología celular, siendo un método fácil que permite observar de manera tridimensional la morfología de las muestras y los cambios o comportamientos en la superficie de los andamios.

Para el examen de la mayoría de los materiales, la muestra se fija, deshidrata y se cubre con una película de oro-carbono evaporado, se monta en un soporte de aluminio y se coloca en la cámara para muestras del MEB. El barrido se consigue con el mismo tipo de exploración que hace recorrer el haz de los electrones sobre la superficie de un tubo de televisión. Los electrones reflejados desde la superficie

(electrones retrodispersos) y los electrones que son expulsados de la superficie (electrones secundarios) son recogidos por uno o más detectores y reprocesados para formar una imagen de alta resolución tridimensional de la superficie de la muestra^[51].

Evaluación de estructura química de los andamios con Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

La espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés) tiene casi 125 años de existencia^[52]. Esta técnica permite investigar e identificar la composición química de una muestra^[4]. En el análisis de FTIR, la absorción de la radiación infrarroja (IR) se produce cuando un fotón se transfiere a una molécula y lo excita a un estado de mayor energía^[53]. Los estados excitados dan lugar a vibraciones de los enlaces moleculares, que ocurren a diferentes tamaños de onda (o frecuencia) en la región IF del espectro de luz^[54].

Existen diferentes técnicas para el estudio de espectroscopía FTIR, como son la de FTIR de transmisión, Reflectancia Total Atenuada (ATR) –FTIR, Espectroscopia de Transformación de Fourier Infrarroja de Reflexión Difusa (DRIFT) y la reflectancia micro-FTIR. La transmisión FTIR es una técnica rápida y relativamente costosa que se ha utilizado ampliamente en la química, la geología, la determinación del proceso en la hidratación, las reacciones con distintos aditivos y la cristalinidad de los productos y otros campos científicos^[55–58]. Los espectros ATR-FTIR proporcionan información química sobre grupos funcionales distribuidos cerca de la superficie de un elemento de reflexión interno. A diferencia de la transmisión de FTIR, la radiación IR no se transmite a través de la muestra ATR-

FTIR, y en consecuencia, la muestra no necesita ser preparada como un gránulo fino. La incorporación del cristal ATR permite al espectro de IR obtener mejores relaciones señal-ruido que se obtiene con el FTIR [59,60]. La espectroscopía FTIR de reflexión difusa (DRIFT) requiere una preparación de muestra más sencilla; El haz IR penetra la muestra analítica hasta cierta profundidad, y luego se re-emite desde la muestra y se enfoca por un espejo sobre el detector. En la figura 1 se muestran esquemas de las diferentes técnicas de FTIR que incluyen: **a)** FTIR de transmisión, **b)** reflectancia total atenuada (ATR) –FTIR, **c)** FTIR de reflexión difusa y **d)** micro-FTIR de reflectancia [54].

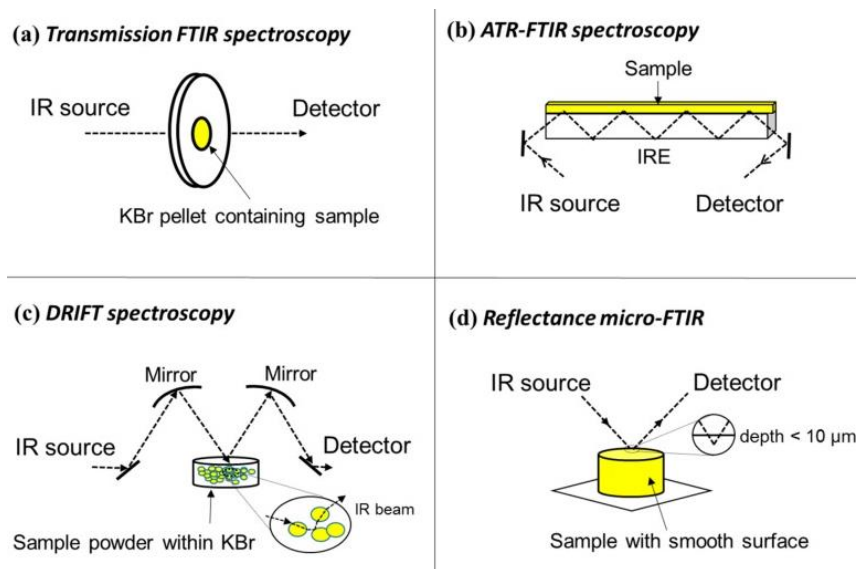


Figura 1. Esquemas simplificados de modos comunes de análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Fuente: Chen Y, Zou C, Mastalerz M, Hu S, Gasaway C, Tao X. Applications of micro-fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in the geological sciences—A Review. Int J Mol Sci. 2015;16(12):30223–50.

La evaluación con FTIR ofrece análisis cuantitativos y cualitativos para muestras orgánicas e inorgánicas, FTIR indica enlaces químicos en una molécula mediante la producción de un espectro de absorción de infrarrojos. Es un instrumento analítico eficaz para detectar grupos funcionales y caracterización de la unión covalente de la información^[61]. En la figura 2 se muestra una imagen con el espectro de PLA^[62].

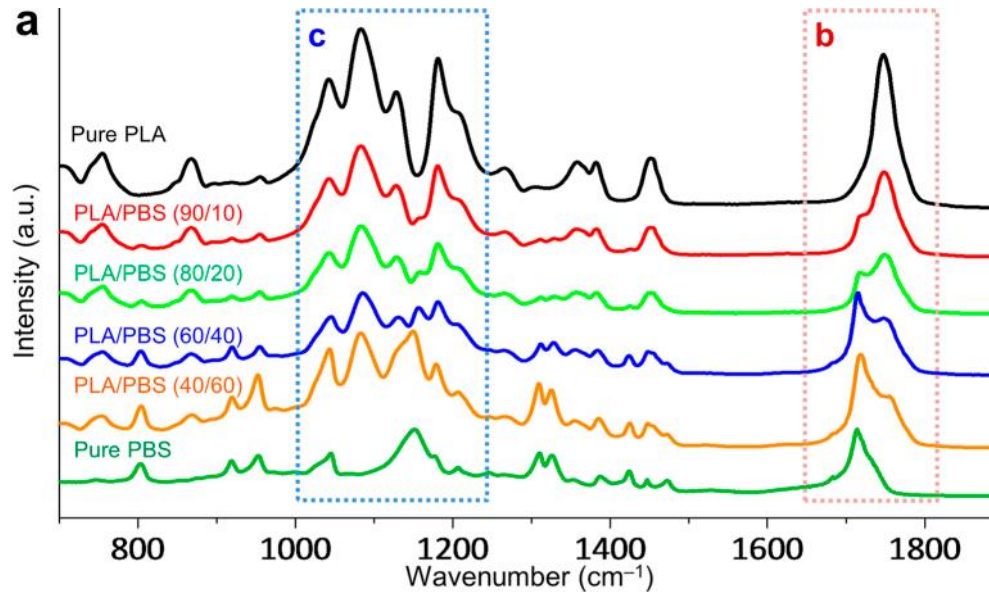


Figura 2. Espectro FTIR de andamios electrohilados de PLA, PLA/PBS (90/10), PLA/PBS (80/20), PLA/PBS (60/40), PLA/PBS (40/60) y PBS. Fuente: Lan X, Huan X, Liang-Bin L, Hsiao BS, Gan-Ji Z, Zhong-Ming L. Biomimetic Nanofibrillation in Two-Component Biopolymer Blends with Structural Analogs to Spider Silk. Sci Rep. 2016;6(34572).

TÉCNICAS DE IMAGEN MOLECULAR PARA LA EVALUACIÓN DE ANDAMIOS *IN VIVO*

Evaluación del grado inflamatorio con Galio 67 (Ga^{67}).

El citrato de Ga^{67} es un fármaco radioactivo que posee una vida media de 78 horas, actúa biológicamente como un análogo del ión férrico. Una vez inyectado por vía intravenosa, el Ga^{67} se une rápidamente a la transferrina y se difunde fuera de los capilares, en los sitios de inflamación hacia el espacio extracelular. En las lesiones inflamatorias este espacio es rico en dos tipos de compuesto que se unen al hierro: lactoferrina (sintetizado por leucocitos) y sideróforos (formados por bacterias). La lactoferrina posee una alta afinidad por el hierro y se une a todo ión férrico libre, con el fin de inhibir el crecimiento de las bacterias; además, tiene mayor afinidad por el citrato de Ga^{67} que la transferrina. La lactoferrina puede, entonces, unirse a la superficie de los macrófagos (que están presentes en el sitio de inflamación o infección). Las bacterias y otros microorganismos patógenos también son capaces de captar directamente el citrato de Ga^{67} , a través de la acción de los sideróforos presentes en la superficie celular del patógeno^[63]. La captación de Ga^{67} es directamente proporcional al metabolismo celular. El Ga^{67} incrementa su concentración en el tejido afectado por la inflamación y procesos infecciosos^[64]. El Ga^{67} es el segundo radiofármaco más utilizado en las exploraciones, aunque para procesos infecciosos el galio sigue siendo el más habitual^[65].

Evaluación del grado inflamatorio con μ SPECT/TC.

La Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Único (SPECT por sus siglas en inglés) es una técnica de gran alcance que utiliza radionúclidos emisores de fotón simple, es decir, que emiten rayos gamma como el tecnecio-99m obteniendo como resultado, imágenes axiales de gran tamaño y alta definición. . El μ CT emite un haz muy fino de rayos X. Este haz incide sobre el objeto que se estudia y parte de este lo atraviesa. La radiación que no ha sido absorbida por el objeto, en forma de espectro, es recogida por los detectores. Luego el emisor del haz, cambia su posición, y vuelve a realizar el proceso anterior hasta abarcar todo el objeto. El ordenador transforma todos los datos recogidos por los detectores, en imágenes virtuales. La microtomografía axial permite la obtención de imágenes 2D de la estructura interna de las muestra, sin necesidad de destruirlas y siendo una técnica conservacionista y no invasiva. Estos cortes de alta resolución, nos muestran la estructura interna, y nos permiten la evaluación anatómica virtual y el análisis morfométrico, de forma muy precisa, de muestras de pequeño tamaño. Además a partir de las imágenes 2D, podemos recrear los modelos en 3D, obteniendo una reconstrucción digital del objeto, permitiendo análisis morfológico, y la observación de formas en las muestras a una alta resolución. La unión de estos dos equipos en un mismo soporte constituye una gammacámara híbrida o SPECT/CT que permite la obtención simultánea de imágenes funcionales y anatómicas de los órganos^[66,67].

3. Planteamiento del Problema

¿De las técnicas de esterilización por óxido de etileno, radiación gamma y plasma, cuál es la mejor para esterilizar andamios nanofibrilares de PLA al 7%, sin dañar su estructura, composición y respuesta biológica?

4. Hipótesis

La esterilización por Plasma da mejores resultados de esterilización para los andamios de PLA al 7% tanto *in vitro* como *in vivo*, en comparación con el Óxido de Etileno y la Radiación gamma.

5. Objetivos

5.2. Objetivo general

Establecer la mejor técnica de esterilización para los andamios de PLA al 7% empleando los métodos de radiación gamma (γ), óxido de etileno (EO) y plasma (H_2O_2), así como evaluar su respuesta inflamatoria en tejido celular subcutáneo de rata macho cepa *Wistar*.

5.3. Objetivos específicos

- Evaluar el método de esterilización para los andamios de PLA al 7% utilizando Radiación Gamma (γ), Óxido de Etileno (EO) y Plasma (H_2O_2).
- Identificar por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) el método de esterilización que no modifique la estructura superficial de las fibras de PLA
- Evaluar por medio de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) el método de esterilización en donde los andamios de PLA no modifiquen su composición química
- Identificar el grado inflamatorio por medio de Micro Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único (μ SPECT/CT por sus siglas en inglés).
- Evaluar la respuesta histológica de los andamios de PLA esterilizados por diferentes métodos en tejido celular subcutáneo de rata *Wistar*.

6. Material y Método

6.1. Clasificación del Tipo de Estudio

El tipo de estudio fue **experimental, prospectivo, longitudinal**.

6.2. Universo de Estudio

48 andamios nanofibrilares de PLA al 7% de 9 mm de diámetro.

9 ratas macho cepa *Wistar* de 250 g del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM.

6.3. Muestra

Para este trabajo se emplearán 48 andamios de PLA al 7% de 9 mm de diámetro de los cuales 12 fueron para su estudio *in vitro* y 36 para la evaluación *in vivo*.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

- Criterios de Inclusión.

Andamios de PLA 7%, cada uno sintetizado bajo las mismas condiciones.

Ratas macho sanas, cepa *Wistar* de 250 g.

- Criterios de Exclusión.

Se consideraron todas las muestras que no tuvieron la concentración de material y tamaño requerido.

Ratas que no cumplieron con el peso y/o que estuvieran enfermas.

-Criterios de Eliminación.

Andamios dañados por causas independientes a alguna técnica de esterilización.

Ratas que desarrollaron alguna patología que no estuvo involucrada en el estudio.

6.4. Material

Los materiales empleados en este trabajo fueron financiados por el proyecto DGAPA-UNAM-PAPIT IN2108 y el DGAPA-UNAM-PAPIT IN209916.

En la tabla 1 se engloban el equipo, insumos, infraestructura y recursos humanos empleados en este proyecto.

Equipo	Insumos		Recursos Humanos	Recursos Animales	Recursos Financieros	Infraestructura
Irradiador gamma	Guantes	Mango de bisturí #3	Isarai Mendieta Barrañón	9 ratas macho cepa <i>Wistar</i>	Pérez DGAPA-UNAM-PAPIT IN2108 Responsable Dr. Marco Antonio Álvarez	Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos DEPeI, UNAM.
Esterilizador de óxido de etileno	Cubrebocas	Hojas de bisturí 15	Dra. Janeth Serrano Bello (Directora)		DGAPA-UNAM-PAPIT IN209916. Responsable Dr. Luis Alberto Medina Velázquez	Laboratorio de Patología DEPeI, UNAM.
Esterilizador de peróxido de hidrógeno	Batas	Espátula 7 A	CD. EOPB. María del Carmen Salazar Vera (Asesora)			Bioterio de la Facultad de Odontología DEPeI, UNAM.
Microscopio Electrónico de Barrido	Lentes	Porta agujas	Mtra. María del Socorro Álvarez Martínez (Sinodal)			Instituto de Física, UNAM.
FTIR	Jabón quirúrgico	Pinzas Kelly curvas y rectas	Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez (Asesor en técnicas de laboratorio)			Instituto Nacional de Cancerología, Laboratorio de Física Médica (INCan).
Histoquinete	Toallas desinfectantes	Pinzas de curación	Dr. Luis Alberto Medina Velázquez (Asesor en Medicina Nuclear)			Instituto de Física UNAM
Microtomo	Campos	Tijeras Iris rectas				Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM
Microscopio óptico	Cajas jumbo de acrílico con tapa para ratas	Tijeras para sutura				
μPET/SPECT/CT (Albira 2009)	Bebedores	Sutura Nylon 5-0				
	Aserrin	Sutura Vicryl 3-0				
	Alimento estándar para roedor (rodent diet 5001)	Agua oxigenada y solución salina estéril				
	Ketamina (80 mg/Kg)	Formol al 10%				
	Xilacina (10mg/kg)	Fracos contenedores para muestra				
	Jeringas de 1 ml	Portaobjetos y cubreobjetos				
	Rasuradora	Colorantes de Hematoxilina y Eosina				
	Yodopavidona	Resina para sellar cubreobjetos				
	Gasas	Polímero sintético, Políácido Láctico (PLA)				

Tabla 1. Lista de los recursos físicos, humanos, animales y financieros.

6.5. Método

PRIMERA FASE (*In vitro*)

Fabricación de andamios de PLA por medio de propulsión de aire (AJS)

El aparato de hilado por propulsión de aire se encuentra dentro de una cámara Plexiglass para aislar el sistema de campos externos y evitar cambios en las condiciones durante el proceso de hilado. El proceso de elaboración de las membranas de PLA, se llevó a cabo disolviendo 7 g/ml de PLA en cloroformo (CHCl_3) bajo agitación magnética a 30°C toda la noche. Para generar las membranas la solución de la concentración fue puesta en un aerógrafo con una aguja de diámetro de 0.3 mm, con una propulsión de aire a 30 psi dirigido a un colector a una distancia de 15 cm recubierto por papel encerado para recolectar las fibras hiladas. (Figura 3)^[68]. Una vez que se realizó el depósito de las fibras, se dejaron secar durante 24 horas y posteriormente con un sacabocados de 9 mm de diámetro se cortaron todas las muestras y se agruparon al azar para su esterilización.

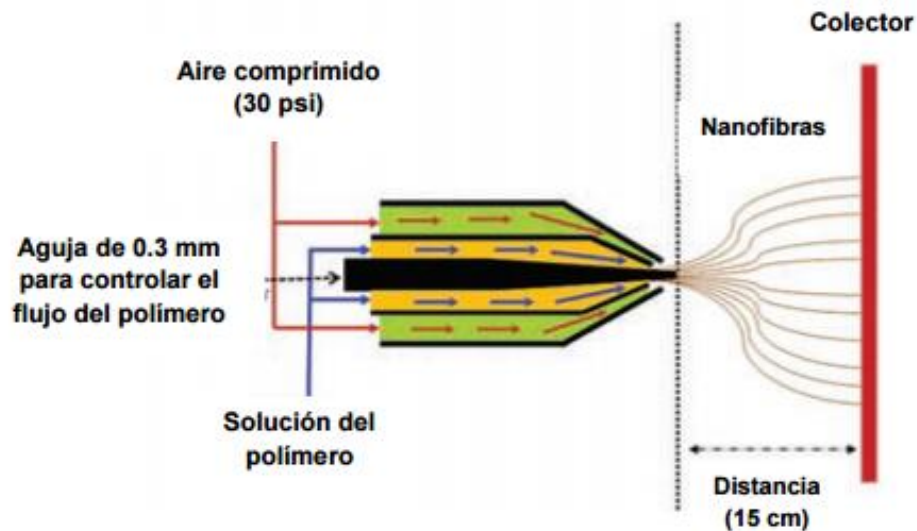


Figura 3. Esquema de la utilización de AJS. Fuente: Camela AS. Tesis de Licenciatura, UNAM. Evaluación de la degradación in vitro de fibras hiladas de (PLA) y la respuesta inflamatoria en ratas Wistar, para su posible uso en regeneración de tejidos.; 2017

TÉCNICAS DE ESTERILIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

Esterilización de Andamios de PLA con Rayos Gamma.

Las muestras se colocaron en tubos de plástico y se metieron a un irradiador **Gammabeam 651PT** tipo alberca profunda con una fuente de radiación de Co^{60} a una dosis de 25 kGy, a temperatura ambiente en la oscuridad^[32,33] en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.

Esterilización de andamios de PLA con óxido de etileno.

Las muestras se metieron en bolsas de papel grado medico PMG[®] para esterilizar en un equipo de óxido de etileno en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), las condiciones fueron al 100% de óxido de etileno con una humedad entre el 40 y 70%, a presión negativa, seguido de un ciclo frío (37 °C) durante 5 horas y un ciclo caliente (55 °C) durante 2 h. Al finalizar, las muestras fueron aireadas durante 12 h para eliminar el gas retenido.

Esterilización por plasma (H_2O_2).

Las muestras se empaquetaron en bolsas de polipropileno de alta densidad (bolsas Tyvek[®]) y se metieron y se esterilizaron en un equipo STERRAD[®] en el Instituto Nacional de Cancerología. El procedimiento de esterilización se llevó a cabo con un ciclo de 54 minutos, a una temperatura de 50°C. Primero se creó un vacío para eliminar el aire de la cámara, seguido por la inyección del líquido de peróxido de hidrógeno, al aumentar la presión en la cámara se logró el contacto del agente esterilizante y el material, esto crea la rotura de la molécula del peróxido de

hidrógeno en agua y oxígeno, finalmente la cámara alcanzó la presión atmosférica y se repitió el ciclo una vez más^[69].

Evaluación de estructura superficial de los andamios de PLA por MEB

La estructura superficial se evaluó por medio de Microscopía Electrónica de Barrido a bajo vacío (JEOL JSM 5600), en el Instituto de Física de la UNAM, las muestras fueron previamente bañadas con nanopartículas de oro evaporado con la finalidad de lograr que el material fuera conductor y así poder facilitar su observación por el haz de electrones del microscopio, así mismo, se montaron en un soporte de aluminio y se colocaron en la cámara para muestras del MEB.

Para evaluar si los diferentes métodos de esterilización modificaban la estructura superficial de los andamios se contabilizó el diámetro de las fibras por medio del programa ImageJ® en el cual se contó cada una de las fibras, los datos se guardaron en Excel y las gráficas se realizaron y analizaron en el programa Origin®.

(Figura 4)

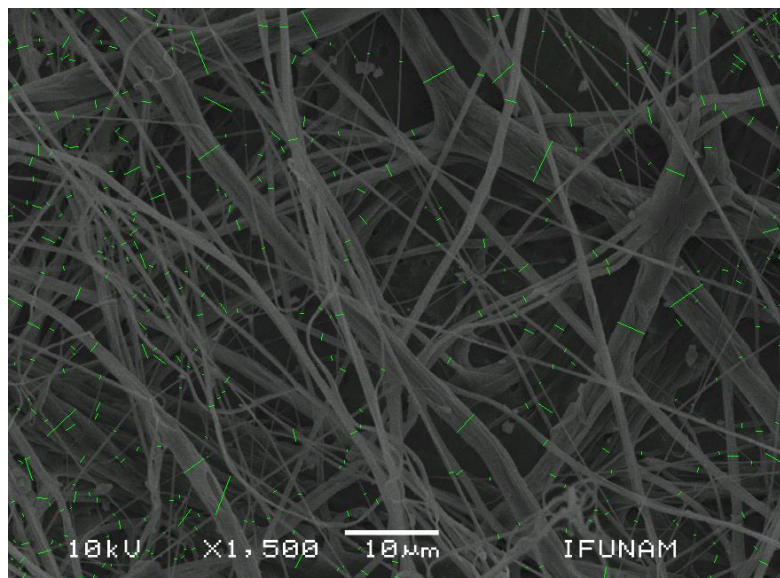


Figura 4. Fotomicrografía obtenida del MEB mostrando la contabilidad de fibras de andamios de PLA al 7%. Fuente: Directa.

Evaluación de los andamios de PLA por medio de FTIR

Este estudio se llevó a cabo en colaboración con el Instituto Politécnico Nacional (IPN). Para caracterizar y confirmar la composición real de cada uno de los andamios se obtuvieron espectros por medio de la técnica de espectroscopía por reflectancia ATR-FTIR. La resolución de los espectros fue de 4 cm^{-1} con un total de 64 barridos. El área de reflectancia total atenuada fue de 2 mm de diámetro y la penetración de la radiación fue de cerca de $2\text{ }\mu\text{m}$.

SEGUNDA FASE (*In vivo*)

Se utilizaron 9 ratas macho cepa *Wistar* de 250 g, las cuales fueron divididas de manera aleatoria para formar 3 grupos a los cuales se les colocó la muestra y se evaluaron a diferentes tiempos 4, 10 y 21 días^[70].

Se siguieron los parámetros de las siguientes normas oficiales de México las cuales regulan el uso y bienestar de los animales de laboratorio:

NOM-062-ZOO1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio^[71].

NOM-029-ZOO-1995. Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosológica^[72].

NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres^[73].

NOM-046-ZOO-1995. Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica^[74].

NOM-051-ZOO-1995. Trato humanitario en la movilización de animales^[75].

Así mismo, los procedimientos establecidos por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Procedimiento quirúrgico con ratas macho cepa *Wistar*

Las ratas se sedaron con Ketamina (80 mg/kg) y Xilocaina (10mg/kg), ambas por vía intramuscular. Se rasuró el lomo de la rata y se realizó antisepsia de rutina, posteriormente se dividió el lomo en cuadrantes, se hizo una incisión lineal de 2 cm para formar un colgajo triangular, posteriormente se suturaron los andamios (uno en cada cuadrante) con nylon 5-0, cabe señalar que el grupo control fue la muestra sin esterilizar (únicamente desinfectada con alcohol). Finalmente se afrontó el colgajo con puntos aislados utilizando vicryl de 3-0 y se realizaron seguimientos postquirúrgicos, valorando el estado general del animal y aspecto de la herida.

Los procedimientos quirúrgicos y el cuidado de los animales, se realizaron en el bioterio de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, los cuales contaron con un fotoperiodo de 12 h, a una temperatura de 22 °C y humedad relativa a 50%, siendo su alimentación (Roodent diet 5001) y agua *ad libitum*.

Evaluación de respuesta inflamatoria en ratas *Wistar* por medio de μ SPECT/CT

Este estudio se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Se utilizaron las mismas 9 ratas macho cepa *Wistar* de 250 g, las cuales fueron anestesiadas con Isoflurano a una dosis de 0.15 ml en 80% de oxígeno, posteriormente en los días 1, 7 y 18 después de la cirugía, fueron inyectadas en la vena caudal con una dosis de 200 μ Ci de Citrato de Ga⁶⁷, finalmente, después de

72 horas de tiempo de distribución del fármaco en cada grupo, se metieron a la equipo de μ SPECT/CT para observar la captación del Galio⁶⁷ en la zona de la lesión y así determinar el grado de inflamación en cada una de las zonas donde se colocaron las muestras en tejido subcutáneo de ratas *Wistar*. (Tabla 2)

Grupo	Día de inyección del fármaco radioactivo	Características	Día de evaluación Inflamatoria en μ SPECT/CT	Día de Sacrificio	Características	Tipo de andamio
1	1	Inyección del fármaco en la vena caudal de las ratas macho <i>Wistar</i>	4	4	Evaluación histológica de los diferentes tipos de condiciones	PLA
2	7	Inyección del fármaco en la vena caudal de las ratas macho <i>Wistar</i>	10	10	Evaluación histológica y si existe respuesta inflamatoria aguda	PLA
3	18	Inyección del fármaco en la vena caudal de las ratas macho <i>Wistar</i>	21	21	Se evaluará el estado y si existe respuesta inflamatoria crónica	PLA

Tabla 2. División de grupos de PLA de manera aleatoria, señalización de días de evaluación, inyección del fármaco radiactivo y/o sacrificio animal.

Sacrificio de los animales y procesamiento histológico

Al finalizar los tiempos establecidos (4, 10 y 21 días), los animales se sacrificaron mediante sobredosis de cloroformo hasta llegar al paro cardiorrespiratorio. Posteriormente se cortó la zona donde se colocaron los andamios teniendo un margen de seguridad de 2 mm, posteriormente las muestras se metieron en formol al 10% durante 24 horas para su fijación. Posteriormente se procesaron de manera histológica por medio de un histokinette, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes seriados de 5 μ m de grosor, los cuales fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina para su evaluación en microscopía óptica.

6.6. Variables

Las variables dependientes e independientes se desglosan a continuación en la tabla 3.

Variables Dependientes			
Variable	Definición operacional	Escala de medición	Categoría
Andamios de PLA	Muestra obtenido de material sintético polimérico	Cualitativa ordinal	Bueno Malo
MEB	Evaluación de la estructura fibrilar de los andamios por MEB	Cualitativa nominal	Descriptiva
FTIR	Evaluación de la composición química de los andamios por FTIR	Cualitativa nominal	Descriptiva
Respuesta Inflamatoria por imagen molecular	Respuesta inflamatoria por injerto de material experimental	Cualitativa ordinal	Leve Moderado Severo
Efecto histológico en tiempo	Efectos en los tejidos secundarios a la implantación de andamios	Cualitativa nominal	Descriptiva
Variables Independientes			
Variable	Definición operacional	Escala de medición	Categoría
Esterilización por radiación gamma	Método de esterilización	Intervalo continua	Correcta Incorrecta
Esterilización por óxido de etileno	Técnica de esterilización	Intervalo continua	Correcta Incorrecta
Esterilización por plasma	Técnica de esterilización	Intervalo continua	Correcta Incorrecta

Tabla 3. Clasificación de las variables dependientes e independientes.

6.7. Diseño estadístico

Los datos fueron evaluados en el programa estadístico SPSS 20.0 (IBM), por análisis de varianza (ANOVA), teniendo como diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$.

7. Resultados

Evaluación de estructura superficial de los andamios de PLA por MEB

Los resultados obtenidos por microscopía electrónica de barrido de los andamios electrohilados de PLA al 7%, esterilizados por las diferentes técnicas son los siguientes; en la Figura 5, se muestra una serie de fotomicrografías en donde la imagen B y D, demuestran que; los andamios esterilizados por radiación gamma presentan mayor cantidad de fibras en comparación con el control (Figura 5, imagen A y C).

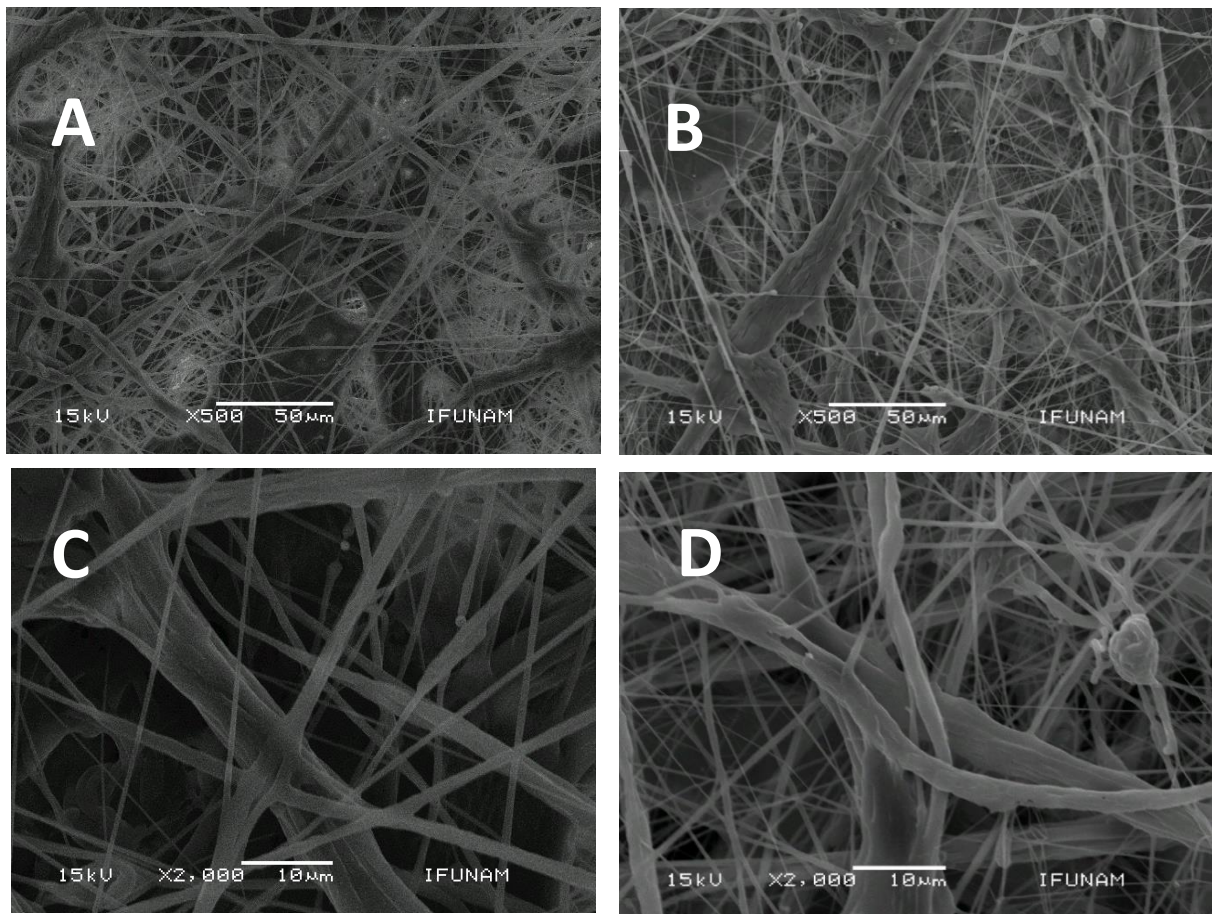


Figura 5. Fotomicrografías de andamios de PLA al 7% a 500x y 2000x (A y C) Control (B y D) esterilizados por Radiación gamma. Fuente: Directa.

En la Figura 6, se puede observar en las imágenes que corresponden a los andamios esterilizados por OE (E y G) y a los que fueron esterilizados con plasma H_2O_2 (F y H), que su estructura fue modificada, ya que se distinguen conglomerados en la superficie del material (flechas), siendo más evidente en los esterilizados por OE.

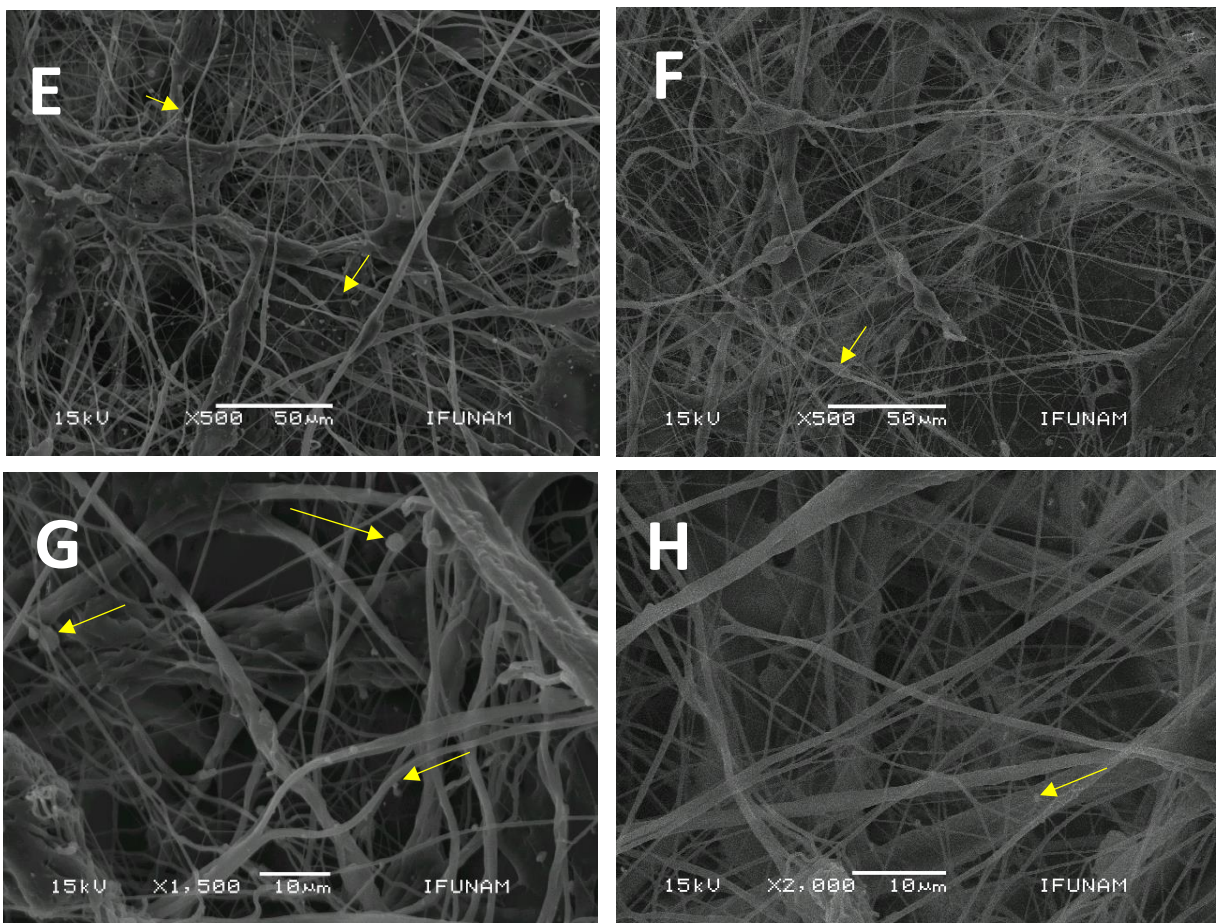


Figura 6. Fotomicrografías de andamios de PLA al 7% a 500x y 2000x (E y G) esterilizados por óxido de etileno (F y H) esterilizados por H_2O_2 . Fuente: Directa.

Para corroborar de manera cuantitativa si existían cambios en la estructura superficial de los andamios esterilizados por diferentes métodos, se cuantificaron los diámetros de las fibras por medio del programa ImageJ® y se obtuvo que los andamios control (sin esterilizar) el diámetro promedio fue de $0.7\mu \pm 0.1$, para los andamios esterilizados con radiación gamma el diámetro disminuyó a $0.5\mu \pm 0.07$, en los andamios esterilizados con óxido de etileno y plasma el promedio del diámetro fue de $0.6\mu \pm 0.1$, siendo menos notable con respecto a los de radiación gamma.

En las figuras 7, 8, 9 y 10 se observa de manera gráfica los promedios con respecto al número de fibras en función del diámetro.

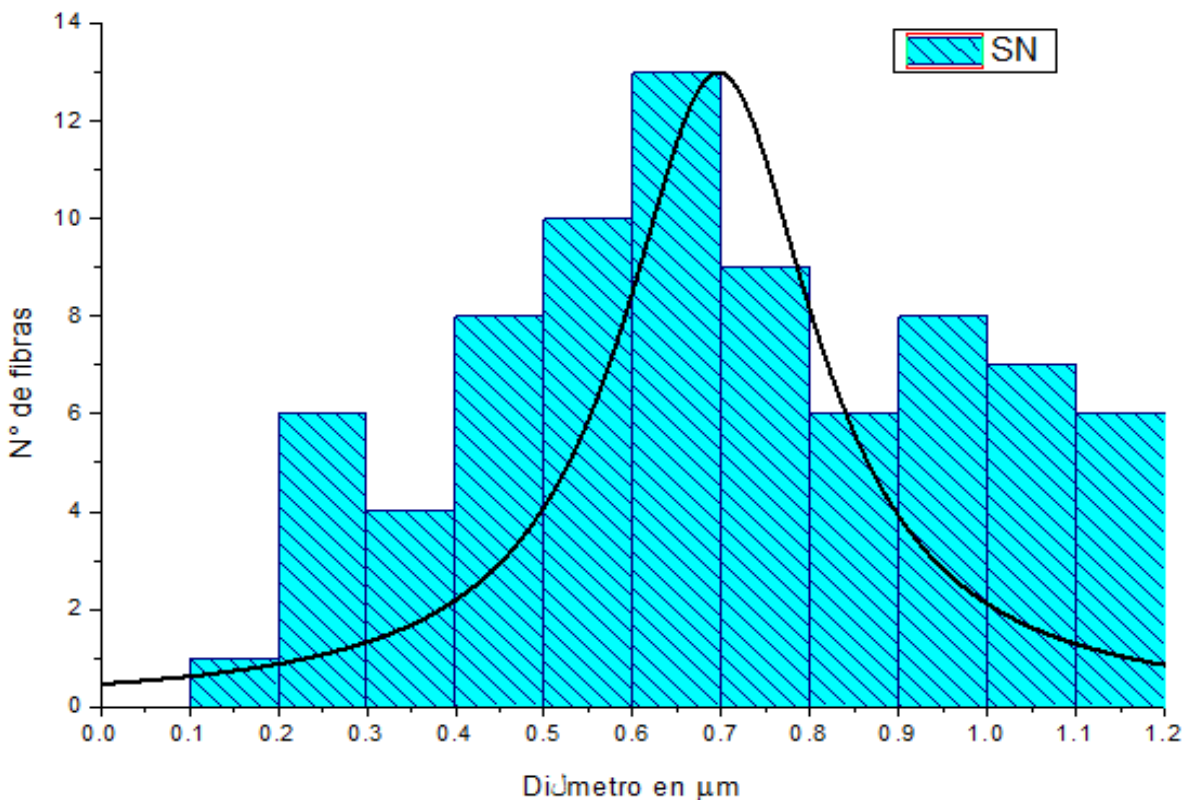


Figura 7. Número de fibras y diámetro del andamio control.
Fuente: Directa.

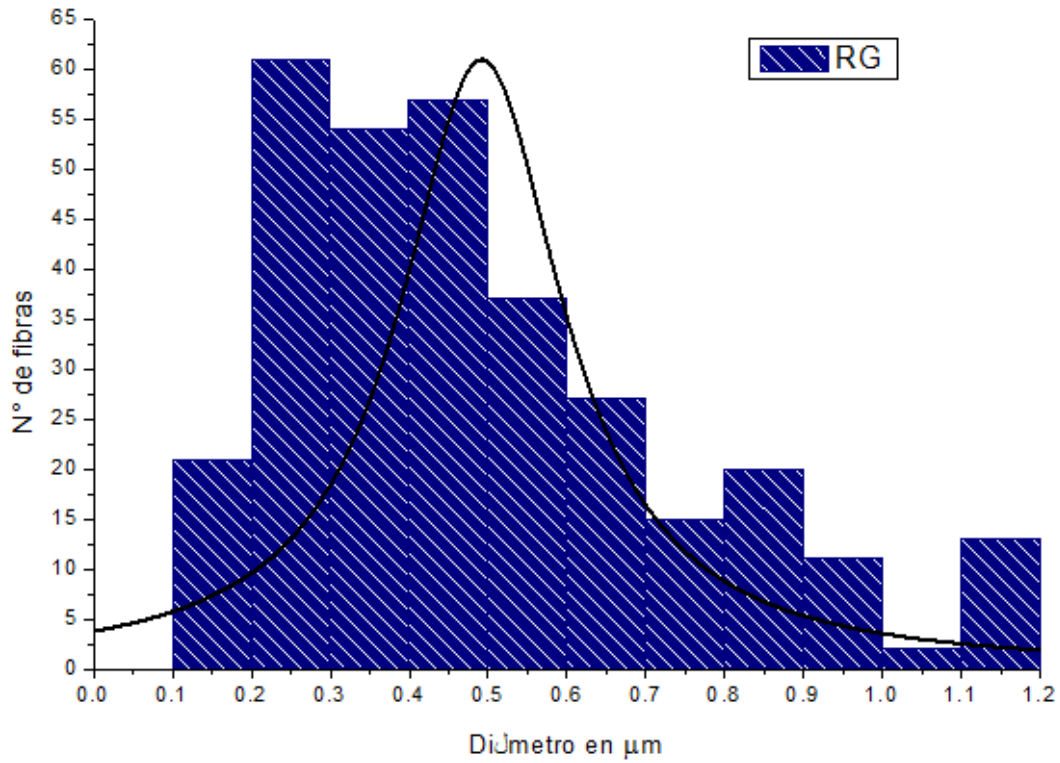


Figura 8. Número de fibras y diámetro del andamio esterilizado con Ry.
Fuente Directa.

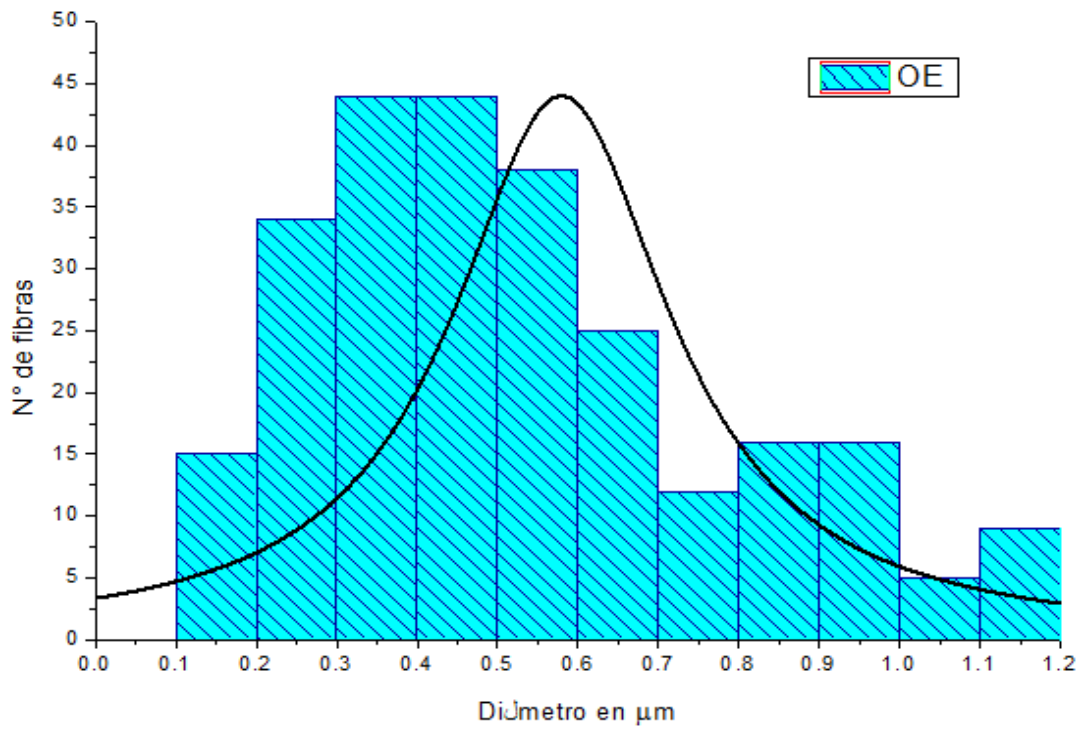


Figura 9. Número de fibras y diámetro del andamio esterilizado con OE.
Fuente: Directa.

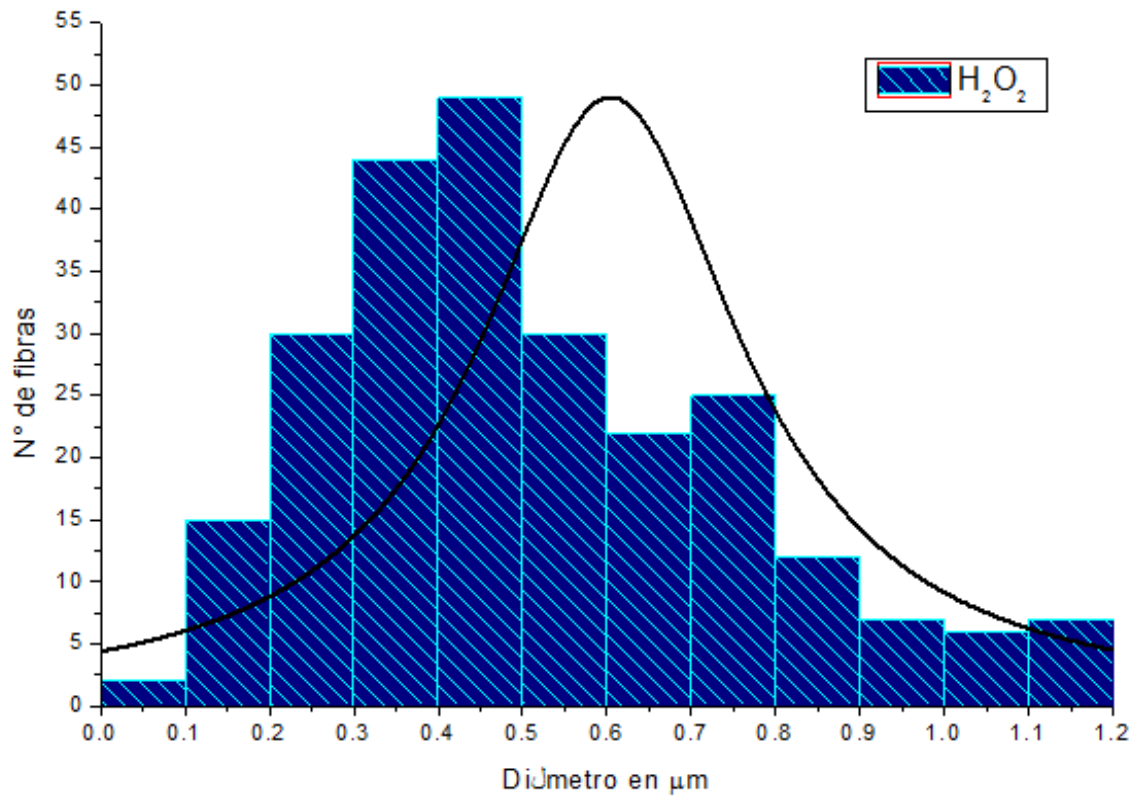


Figura 10. Número de fibras y diámetro del andamio esterilizado con H₂O₂.
Fuente: Directa.

Evaluación de los andamios de PLA por medio de FTIR

Los resultados obtenidos por medio de espectroscopía por reflectancia de FTIR, demuestran que no hubo presencia de cambios significativos en ninguna de las diferentes técnicas de esterilización, radiación gamma, óxido de etileno y plasma, en las figuras de la 11 a la 14 se observan los espectros individuales los cuales muestran el patrón característico del PLA **(A)**, dióxido de carbono **(B)** y agua **(C)**, en la figura 15 se pueden comparar las cuatro condiciones observando que no existe diferencia entre ellas, siendo para **a)** radiación gamma, **b)** plasma, **c)** óxido de etileno y **d)** control.

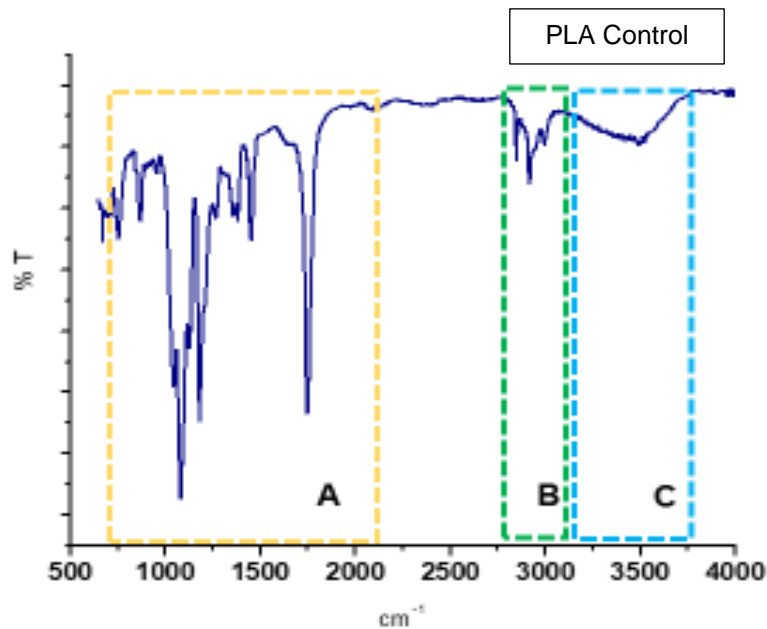


Figura 11. Espectro FTIR del andamio nanofibrilar control de PLA.
Fuente: Directa.

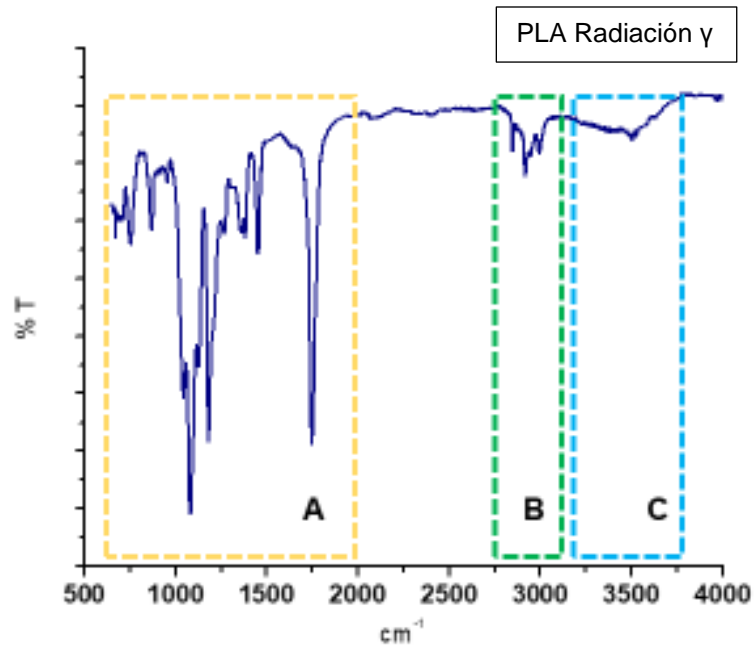


Figura 12. Espectro FTIR del andamio nanofibrilar de PLA esterilizado con radiación gamma. Fuente: Directa.

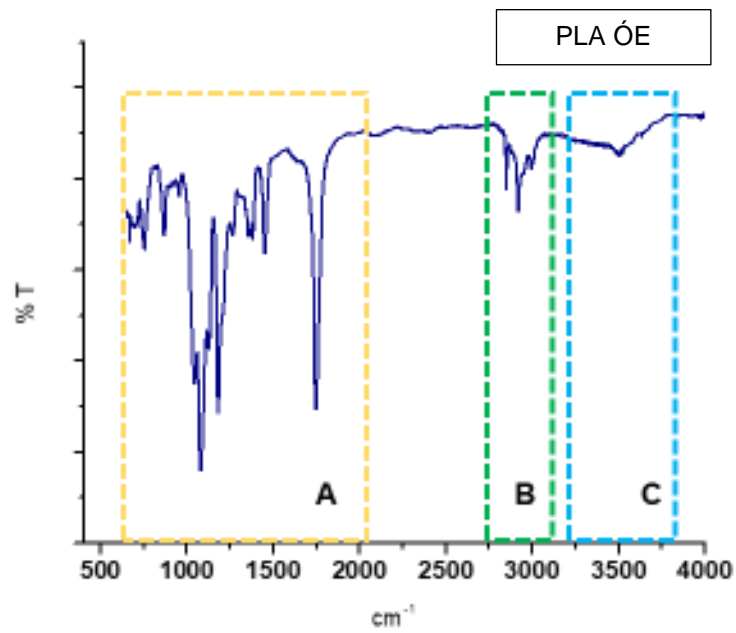


Figura 13. Espectro FTIR del andamio nanofibrilar de PLA esterilizado con óxido de etileno. Fuente: Directa.

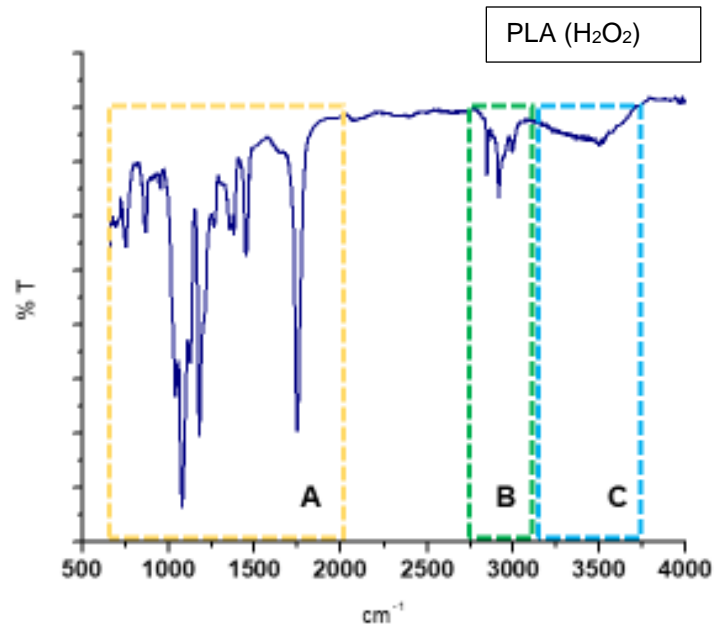


Figura 14. Espectro FTIR del andamio nanofibrilar de PLA esterilizado con plasma (H₂O₂). Fuente: Directa.

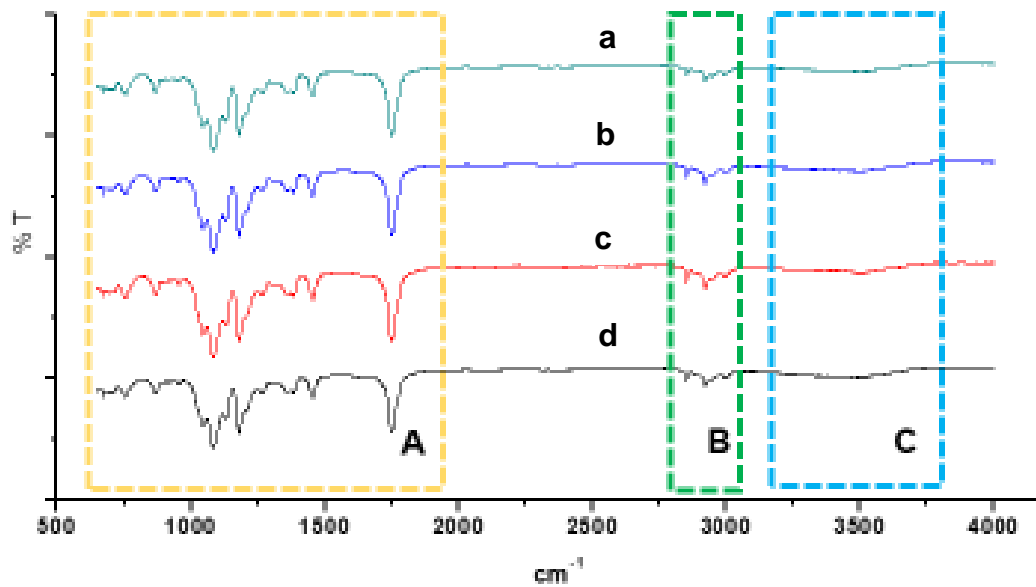


Figura 15. Espectros FTIR de los andamios nanofibrilares de PLA esterilizado con las diferentes técnicas. Fuente: Directa

Evaluación de respuesta inflamatoria en ratas *Wistar* por medio de μ SPECT/CT

Los resultados obtenidos del μ SPECT/CT, demuestran que el Ga^{67} se unió en las zonas correspondientes donde se implantaron los andamios de PLA, en la figura 16 se observa en **a**, la ubicación de la cuatro muestras en el lomo de ratas *Wistar*, en **b**, se muestran los resultados al día 4 de evaluación, en el cual el fármaco se observa en las 4 zonas donde se colocaron las muestras, siendo más evidente en el andamio control y en el de óxido de etileno, en **c**, se muestran los resultados del día 10 de evaluación, en donde se observa mayor captación del radiofármaco en las zonas de los andamios control, óxido de etileno, en menor medida en el de radiación gamma y sin captación en la zona correspondiente a plasma, en **d** se muestran los resultados al día 21 de evaluación en donde el radiofármaco Ga^{67} muestra claramente una disminución de la captación, siendo más evidente la disminución en los andamios esterilizados con radiación y y con H_2O_2 .

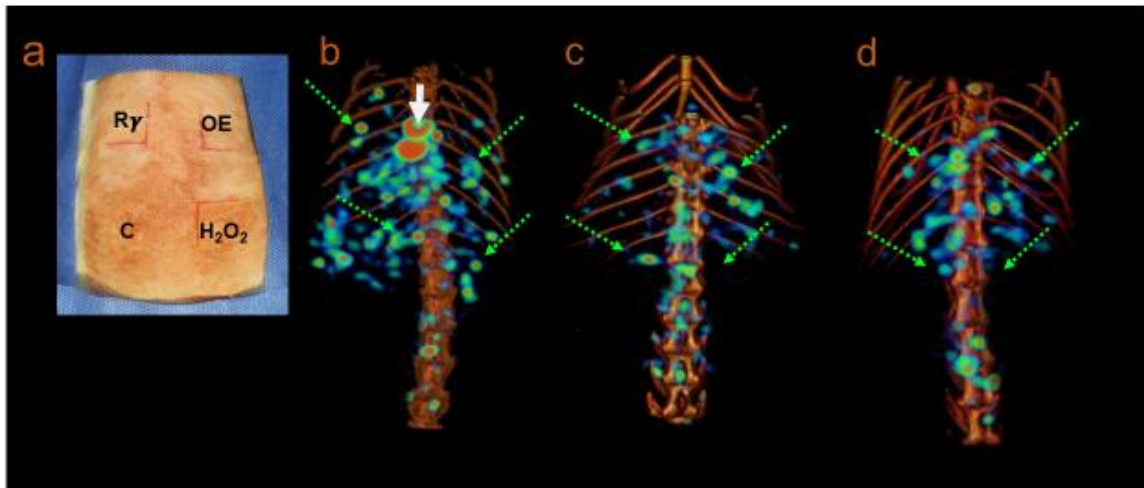


Figura 16. a) Ubicación de los andamios en el lomo de la rata. Imágenes fusionadas de μ SPECT-CT a diferentes tiempos. Fuente: Directa.

Evaluación histológica de la respuesta inflamatoria en tejido subcutáneo en ratas *Wistar*

Respuesta a 4 días post implantación

En la figura 17 se observan fotomicrografías de cortes histológicos teñidos con H y E a diferentes aumentos correspondientes a los 4 días de evaluación, donde se observan en las cuatro condiciones las fibras del material implantado y moderado infiltrado inflamatorio crónico para los cortes correspondientes al grupo control, en los cortes correspondientes a óxido de etileno y plasma presentan infiltrado inflamatorio leve con células gigantes de cuerpo extraño, siendo menos evidentes en los esterilizados por plasma, en el caso de los cortes correspondientes a radiación gamma se observa moderado infiltrado inflamatorio crónico también con células de tipo cuerpo extraño.

Respuesta a 10 días post implantación

En la figura 18 se observan fotomicrografías de cortes histológicos teñidos con H y E a diferentes aumentos correspondientes a los 10 días de evaluación, donde se observa la presencia del material y alrededor moderado infiltrado inflamatorio crónico para los cortes correspondientes al grupo control y abundantes células gigantes multinucleadas de tipo cuerpo extraño, en los cortes correspondientes a radiación gamma y óxido de etileno presentan infiltrado inflamatorio severo con moderadas células gigantes de cuerpo extraño, siendo menos evidentes en los esterilizados por radiación gamma, en el caso de los cortes

correspondientes a plasma se observa moderado infiltrado inflamatorio crónico con escasas células de tipo cuerpo extraño.

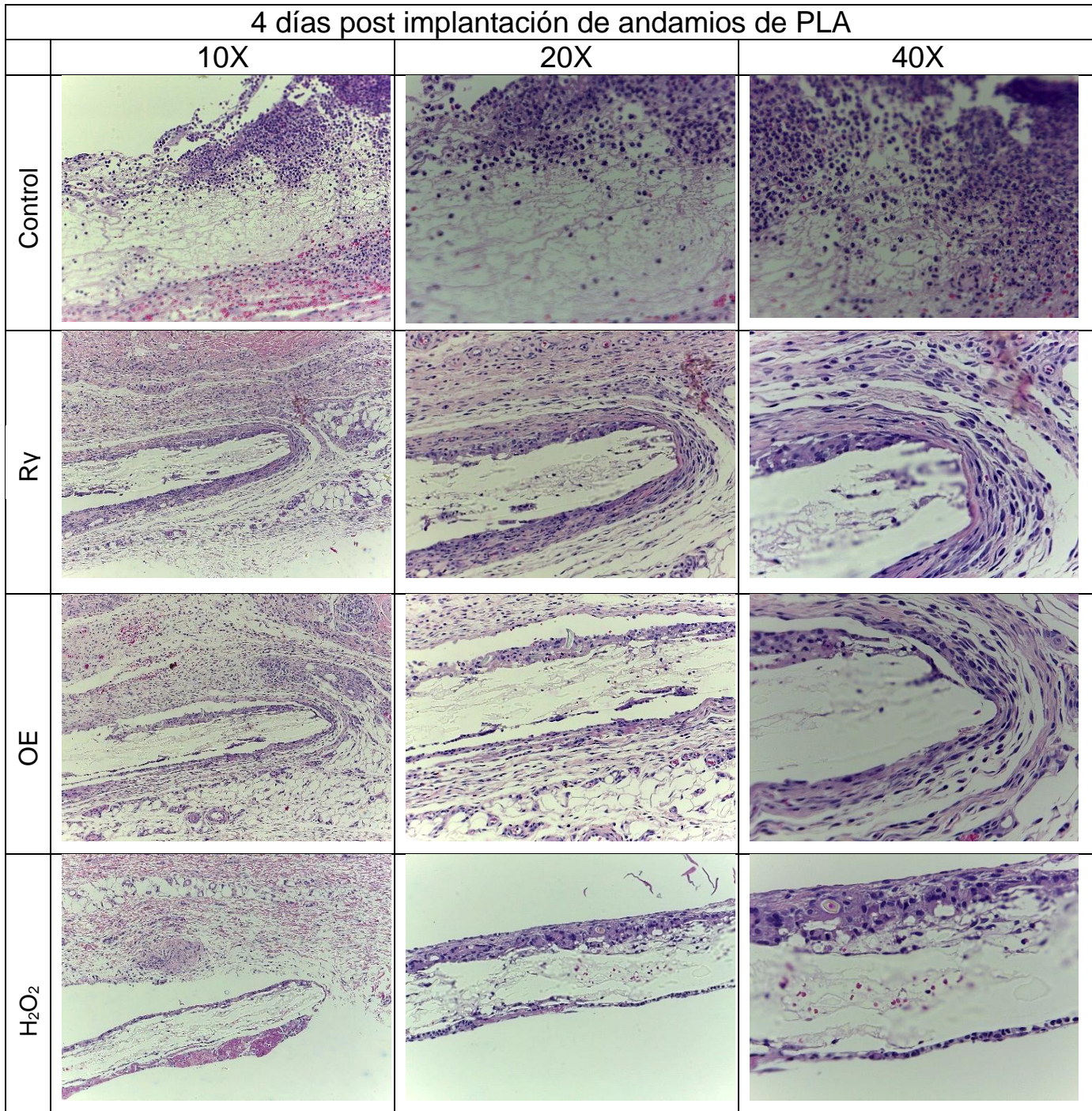


Figura 17. Fotomicrografías de cortes histológicos teñidas con H y E correspondientes a los 4 días posteriores a la implantación de andamios de PLA a 7%. Fuente: Directa.

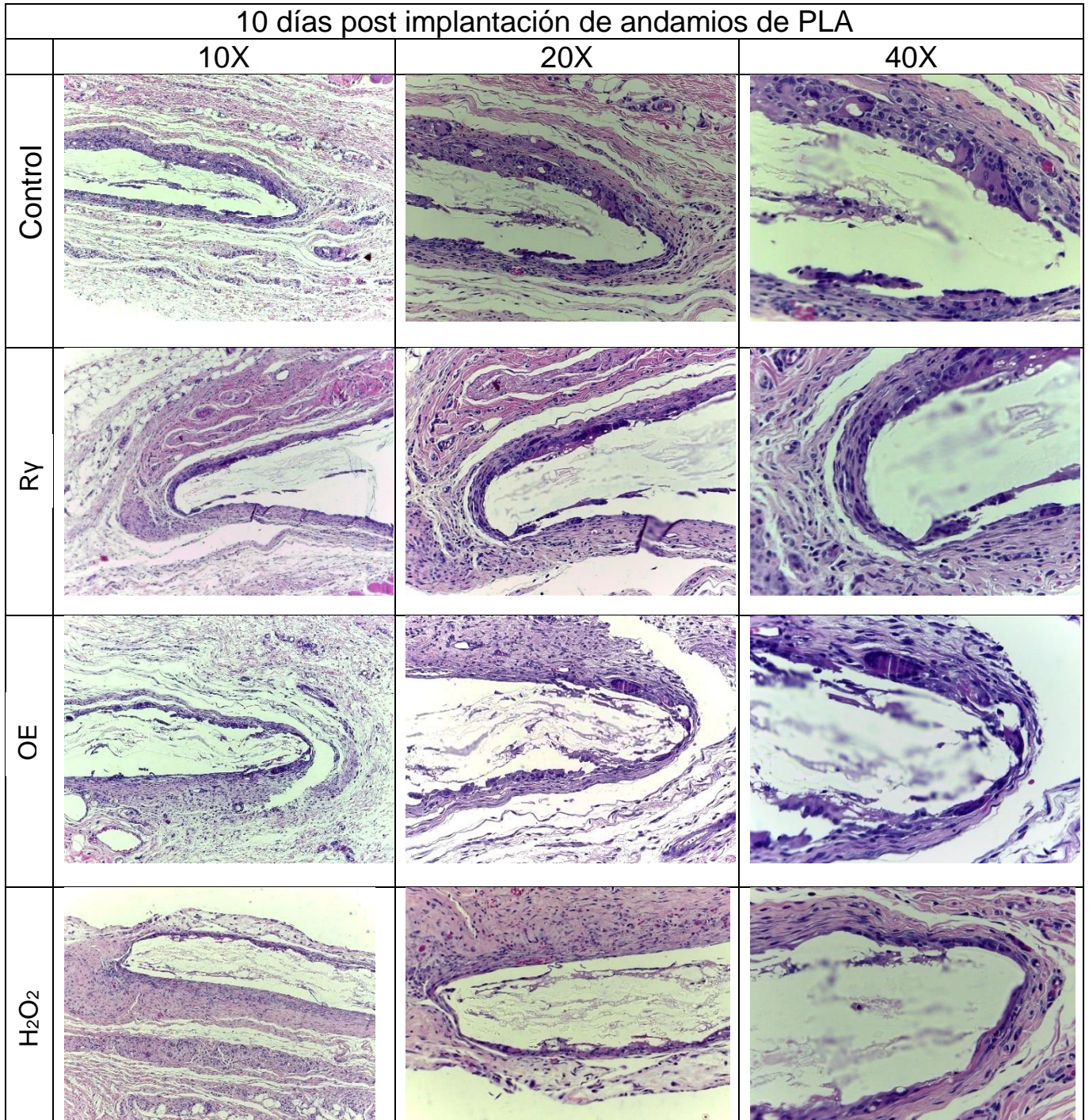


Figura 18. Fotomicrografías correspondientes a los 10 días post implantación de los andamios de PLA al 7%. Fuente: Directa.

Respuesta a 21 días post implantación

En la figura 19 se observan cortes histológicos teñidos con H y E correspondientes a los 21 días de evaluación, donde se observa diferentes aumentos. En el grupo control se observa infiltrado inflamatorio crónico con abundantes células gigantes de cuerpo extraño, en los cortes correspondientes a radiación gamma y óxido de etileno presentan infiltrado inflamatorio severo con abundantes células gigantes de cuerpo extraño, siendo menos evidentes en los esterilizados por óxido de etileno, en el caso de los cortes correspondientes a plasma se observa una disminución en el infiltrado inflamatorio así como en las células gigantes de tipo cuerpo extraño.

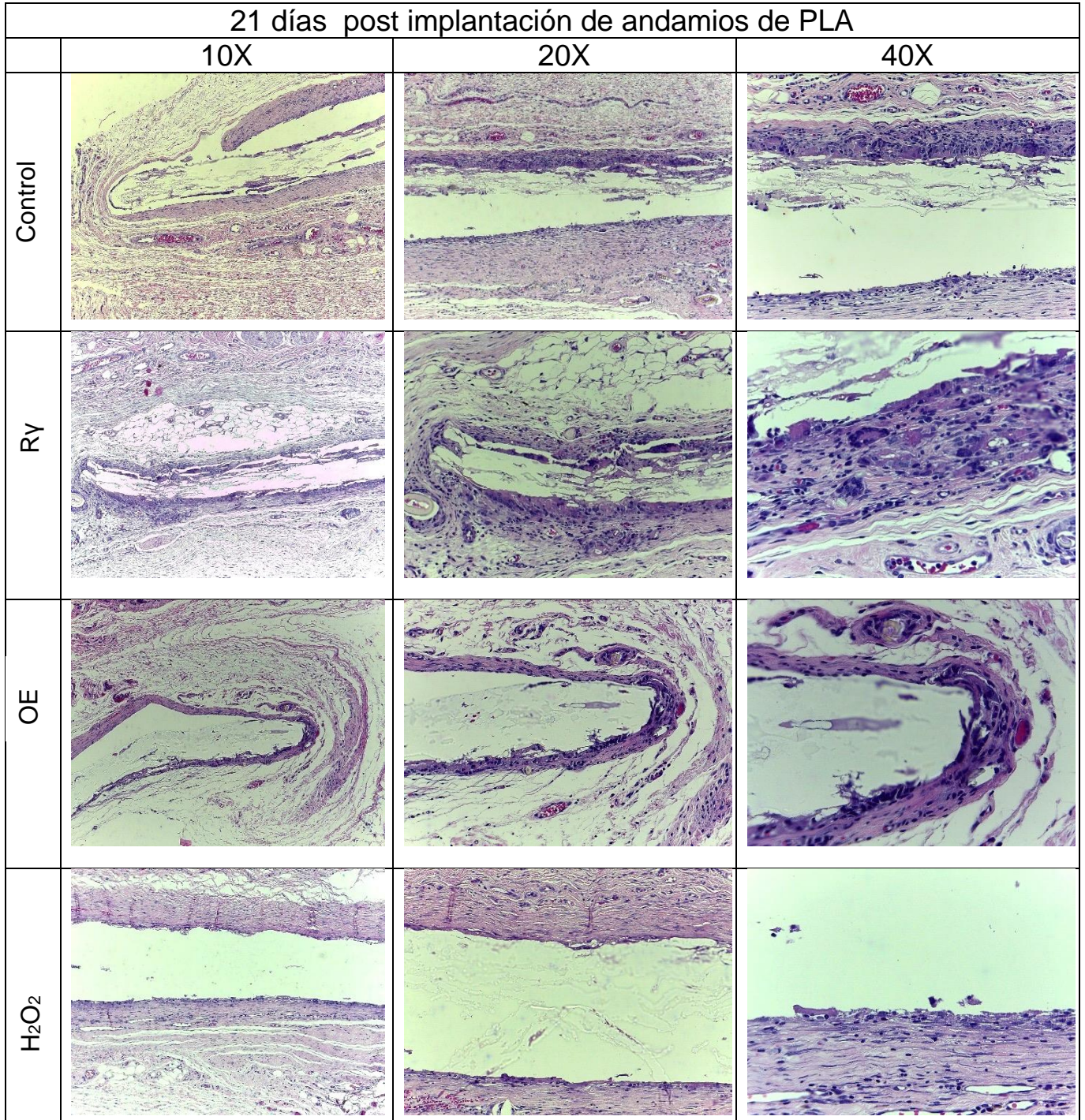


Figura 19. Fotomicrografías correspondientes a los 21 días de evaluación de los andamios de PLA al 7%. Fuente: Directa.

8. Discusión

Algunos autores como Colorado y cols^[19] mencionan que los biomateriales utilizados para interacción directa con tejidos biológicos, deben cumplir con ciertas propiedades físico-químicas y biológicas, además deben presentar baja toxicidad, en el trabajo de Chachques y cols^[1], refieren que los biomateriales tiene un papel principal en la bioingeniería de tejidos, porque deben servir no sólo de apoyo físico a las células, sino también tienen que proveer las sustancias químicas y biológicas necesarias para guiar el crecimiento, diferenciación, implantación, distribución y organización celular. Dichos biomateriales al ser implantados en el organismo deben de estar libres de bacterias, hongos y/o virus. Es por ello, que en este trabajo se estudiaron las diferentes técnicas de esterilización en los andamios de PLA al 7%, el cual es considerado un material de alta compatibilidad haciendolo un buen candidato para su utilización en bioingeniería de tejidos, por tal motivo es necesario dilucidar cual de las técnicas de esterilización cumplen con la mayoría de las propiedades biológicas para lograr una interacción directa con tejido biológico, esto encaminado en un futuro para lograr una traslación a la clínica.

Algunos investigadores como Valente y cols^[33], mencionan que en los andamios esterilizados con óxido de etileno, conducen a la pérdida de orientación de las fibras, resultando una modificación en su morfología de estructura superficial, así como una alta toxicidad y de los andamios, en los resultados obtenidos en este trabajo, en la observación por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), los andamios esterilizados con este medio, coinciden en que la estructura superficial se modifico formando pequeños cumulos, sin embargo, para las muestras de los

andamios de PLA esterilizados por radiación gamma con una dosis de 25 kGy, una temperatura entre 30-40°C y una fuente de 60Co, las muestras modificaron su superficie, ya que las fibras que la constituyen son de mayor cantidad, sin embargo Valente y cols, mencionan que no influye esta técnica en la morfología o alineación de las fibras, contrastantemente estudios como el de Loo y cols^[37]. así como en el de Cottam y cols^[38], mencionan que debido a la formación de radicales libres y la posible reticulación de las fibras del PLA, al ser esterilizadas por esta técnica, se estén haciendo más delgadas así como el diámetro nanofibrilar del PLA con respecto al andamio control.

Para el análisis de las muestras esterilizadas con plasma (H₂O₂) Redigueri y cols^[27], mencionan que existe una conservación de la morfología de las fibras, así como su porosidad y su composición química, en este estudio de investigación, se realizó la misma evaluación para los andamios de PLA resultando que en la estructura superficial el diámetro de las nanofibras es muy parecido a los andamios del grupo control; concordando con Redigueri. Por otro lado, Silinder^[50] menciona que ésta técnica es apropiada para la esterilización de materiales termosensibles.

En las pruebas para determinar la composición química y grupos moleculares de los andamios nanofibrilares de PLA al 7%, por medio de FTIR, Valente y cols^[33], mencionan que existe una cristalización de los andamios esterilizados por óxido de etileno, en el estudio de Rutala y cols^[46], mencionan que los tres métodos de esterilización, radiación γ , EO y H₂O₂, modifican las propiedades fisicoquímicas de los andamios de PLA, así como también Bhatnagar y cols^[76], en su trabajo, mencionan que aunque sea mínimo, todas las técnicas de esterilización modifican

de manera física y química el polímero, sin embargo, para los andamios de PLA al 7% incluidos en el presente trabajo, los resultados indican que no hubo una modificación significativa en la composición en los esterilizados con las diferentes técnicas en comparación con el andamio control de nanofibras de PLA al 7%, y quizá la cristalización sea solo un conglomerado del polímero debido a los resultados obtenidos por FTIR, por lo que de manera química no se modifica este polímero al someterlo a cualquiera de estas técnicas de esterilización.

En el estudio de Duch^[63] menciona que el citrato de Ga⁶⁷ es un fármaco radioactivo que posee una vida media de 78 horas y que tiene una concentración mayor del fármaco en donde existe inflamación, esto debido a su adherencia a las bacterias y leucocitos, sin embargo, para este trabajo basado en ratas, las horas de vida media podrían estar lejos de lo reportado en la literatura, y aunque se encontró captación del concentrado del radiofármaco en la zona donde se realizó la prueba no existe una claridad para poder diferenciar las características de las técnicas de esterilización en los andamios injertados, así como su respuesta inflamatoria, por ello, proponemos que se siga estudiando esta técnica para obtener resultados más concretos.

En el estudio de Broon y cols^[70], mencionan que los tiempos de 4, 10 y 21 días de evaluación y respuesta inflamatoria en tejido celular subcutáneo de rata *Wistar* son convenientes para obtener resultados verídicos y de diferenciación en células inflamatorias, en el presente trabajo se obtuvieron resultados visibles a la diferencia de días, por lo que se está de acuerdo con el autor en los tiempos de evaluación para poder determinar la respuesta inflamatoria de manera histológica.

9. Conclusiones

- Todas las técnicas de esterilización empleadas modificaron la estructura superficial de las muestras, en mayor medida las sometidas a óxido de etileno, (formación de cúmulos).
- La técnica de esterilización por radiación gamma modifica el diámetro de las fibras haciéndolas más delgadas.
- Las diferentes técnicas de esterilización utilizadas no modifican la composición química de los andamios, en la evaluación por FTIR.
- Se encontró captación del radiofármaco en la zona de implantación sin embargo, es necesario realizar la cuantificación de la dosis acumulada para dilucidar por esta técnica el nivel de inflamación.
- De manera *in vivo*, los andamios esterilizados por plasma (H_2O_2), generaron una menor cantidad de células gigantes de tipo cuerpo extraño al día 10 de evaluación, en comparación con los andamios esterilizados por EO y radiación γ . Esta respuesta inflamatoria desapareció al día 21, además, en este tipo de esterilización se observa una reabsorción más rápida del material en comparación con los demás métodos.

Con base en los resultados obtenidos de manera *in vitro* e *in vivo* los andamios de PLA al 7%, esterilizados por plasma, dieron mejores resultados en comparación con los andamios esterilizados con los métodos de EO y radiación γ . Por ello, se propone que para este tipo de muestra en específico la esterilización con plasma (H_2O_2) es la mejor estrategia a seguir en cuanto a esterilización.

10. Referencias Bibliográficas

1. Chachques JC, Herreros J, Trainini JC, Lago N, Díez Solórzano L, Tascón V, et al. Ingeniería tisular y miocardio bioartificial. *Cirugía Cardiovasc* [Internet]. 2011;18(3):217–24. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1134009611700572>
2. Ribeiro L, Castro E, Ferreira M, Helena D, Robles R, Faria e Almeida A, et al. Conceptos y aplicaciones de la ingeniería tisular en Otorrinolaringología. *Acta Otorrinolaringológica Española*. 2015;66(1):43–8.
3. Rosales Ibáñez R, Alvarado Estrada KN, Ojeda Gutiérrez F. Ingeniería Tisular en Odontología. *Rev Adm*. 2012;VOL. LXIX(4):164–7.
4. Hernández Figueroa C. Obtención de andamios de colágeno para la restauración del tejido del miocardio. 2016;VII(3):15–24.
5. Estrada Catalina, Paz Ana Cristina LLE. Ingeniería de tejido óseo: Consideraciones básicas. *Rev EIA*. 2006;5:93–100.
6. German F, Atala A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch argent pediatr*. 2000;98(2):103–15.
7. Fabres V C. Técnicas del futuro: ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina reproductiva. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2010;21(3):488–93.
8. Montoya Y, Ortiz IC, Hoyos LM. Cardiología. *Rev Colomb Cardiol*. 2017;24(2):182–90.

9. Vera Graziano R. Preparation and characterization of scaffold nanofibers by electrospinning , based on chitosan and fibroin from Silkworm (Bombyx mori) quitosano y fibroína del capullo (Bombyx mori). 2017;134–46.
10. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Mater Today. 2011;14(3):88–95.
11. Yoganarasimha S, Trahan WR, Best AM, Bowlin GL, Kitten TO, Moon PC, et al. Peracetic Acid: A Practical Agent for Sterilizing Heat-Labile Polymeric Tissue-Engineering Scaffolds. Tissue Eng Part C Methods [Internet]. 2014;20(9):714–23. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/full/10.1089/ten.tec.2013.0624%5Cnhttp://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tec.2013.0624>
12. Ochoa S, Aguilar N, Méndez A. Investigación y Ciencia. Ing tejidos Una nueva Discip en Med Regen [Internet]. 2012;64:61–9. Available from: <http://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/numero/429/el-futuro-de-la-energa-elica-8652>
13. Ibarra C, Garciadiego D, Martínez V, Velasquillo C. Ingeniería de tejidos y osteoartritis. Reumatol Clínica [Internet]. 2007;3(Supplement 3):S19–22. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1699258X07736501>
14. Sequeda LG, Díaz JM, Gutiérrez SJ, Perdomo SJ, Gómez OL. Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. Rev Colomb Ciencias Químico-

- Farmacéuticas. 2012;41(1):50–66.
15. MacNeil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* [Internet]. 2007;445(7130):874–80. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature05664> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17314974>
 16. Rocha ACR, Padrón GH, Garduño MVG, Aranda RLG. Análisis físicoquímico del MTA Angelus® y Biodentine® mediante difracción de rayos X, espectrometría de energía dispersiva, fluorescencia de rayos X, microscopio electrónico de barrido y espectroscopía de rayos infrarrojos. *Rev Odontológica Mex* [Internet]. 2015;19(3):174–80. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1870199X15000221>
 17. Okpara-Hofmann J, Knoll M, Dürr M, Schmitt B, Borneff-Lipp M. Comparison of low-temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization for endoscopes using various Sterrad™ models. *J Hosp Infect* [Internet]. 2005 Apr [cited 2017 Jun 20];59(4):280–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670104004001>
 18. Rezwan K, Chen Q Z, Blaker J J RB. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27:3413–31.
 19. Colorado AC, Agudelo CA, Moncada A ME. Análisis de Biomateriales para uso en ingeniería de tejidos de piel. *Rev ing biomed*. 2013;7:11–23.
 20. Sabino MA, Loaiza M, Dernowsek J, Rodrigo R. EN INGENIERÍA DE

TEJIDOS TECHNIQUES FOR MANUFACTURING POLYMER SCAFFOLDS WITH POTENTIAL APPLICATIONS IN TISSUE ENGINEERING Artículo Invitado (ASAP). Rev Lat Met MA. 2017;37(2).

21. Zhang L, Webster TJ. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today*. 2009;4(1):66–80.
22. Beltrán F., Pérez E, Cerrada ML, de la Orden MU, Martínez-Urreaga J. Caracterización por espectroscopía IR de cambios estructurales del poli(ácido láctico) en presencia de agua. efecto de la incorporación de arcillas. *Avances en Materiales Poliméricos. XIV Reunión del Grupo Especializado de Polímeros (GEP) de la RSEQ y RSEF*". 2016. 87-88 p.
23. Jiménez P, Sibaja M, Vega-Baudrit J. Síntesis y caracterización de Poli(Ácido L-Láctico) por policondensación directa, obtenido del fermento de desechos agroindustriales de banano (*Musa acuminata* AAA variedad Cavendish cultivar Gran naine) en Costa Rica. *Rev Oberoamericana Polímeros*. 2012;13(2):52–9.
24. Khorshidi S, Solouk A, Mirzadeh H, Mazinani S, Lagaron JM, Sharifi S, et al. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2016 Sep [cited 2017 Mar 1];10(9):715–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25619820>
25. Lizarbe MA. Sustitutivos De Tejidos: De Los Biomateriales a La Ingeniería Tisular. *CiencExactFísNat (Esp)*. 2007;101(1):227–49.

26. Silverman J. Radiation processing: The industrial applications of radiation chemistry. *J Chem Educ* [Internet]. 1981;58(2):168. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed058p168>
27. Rediguieri F, Corte R, Dua K, Satiko I, Terezinha De J, Pinto A. Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering. *Eur Polym J* [Internet]. 2016;82:181–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.07.016>
28. Augustine R. Sterilizability of electrospun PCL / ZnO nanocomposite membranes by gamma irradiation. Vol. 64, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2015. p. 526–33.
29. FI-UNAM, Grupo-de-Ingeniería-Nuclear, Martín del Campo C. Apuntes de Fundamentos de Ingeniería Nuclear Guía de estudio para examen de admisión a Maestría en Ingeniería , Campo Energía Área Sistemas Energéticos Subdisciplina Sistemas Nucleoeléctricos Contenido. 2010;1–52.
30. Asepsia y Antisepsia [Internet]. Fac. de Medicina, UNAM. [cited 2017 Jul 17]. Available from: <http://proyectos.cuaed.unam.mx/uapa/medicina/asepsia/>
31. Rodríguez FL. Aceleradores de partículas: Irradiación de iones y electrones. *Inst Física, UNAM*. 2009;1–38.
32. Bosworth LA, Gibb A, Downes S. Gamma irradiation of electrospun poly(ϵ -caprolactone) fibers affects material properties but not cell response. *J Polym Sci Part B Polym Phys*. 2012;50(12):870–6.
33. Valente TAM, Silva DM, Gomes PS, Fernandes MH, Santos JD, Sencadas V.

- Effect of sterilization methods on electrospun poly(lactic acid) (PLA) fiber alignment for biomedical applications. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(5):3241–9.
34. Athanasiou K. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* [Internet]. 1996 Jan [cited 2017 Jul 19];17(2):93–102. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0142961296857541>
35. Kanjickal D, Lopina S, Evancho-Chapman MM, Schmidt S, Donovan D. Effects of sterilization on poly(ethylene glycol) hydrogels. *J Biomed Mater Res Part A* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2017 Jul 20];87A(3):608–17. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.31811>
36. Premnath V, Harris WH, Jasty M, Merrill EW. Gamma sterilization of UHMWPE articular implants: an analysis of the oxidation problem. *Biomaterials* [Internet]. 1996 Sep [cited 2017 Jul 19];17(18):1741–53. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0142961295003495>
37. Loo JSC, Ooi CP, Boey FYC. Degradation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(l-lactide) (PLLA) by electron beam radiation. *Biomaterials* [Internet]. 2005 Apr [cited 2017 Jul 19];26(12):1359–67. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961204004429>
38. Cottam E, Hukins DWL, Lee K, Hewitt C, Jenkins MJ, Wallace WA, et al. Effect of sterilisation by gamma irradiation on the ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material. *Med Eng Phys* [Internet]. 2009 31(2):221–6.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760952>

39. López L. Óxido De Etileno , Utilización Como Agente Esterilizante Y Riesgos Para La Salud Del Personal Sanitario. CES Salud Pública [Internet]. 2014;5:154–62.
http://revistas.ces.edu.co/index.php/ces_salud_publica/article/view/3019
40. Mendes GCC, Brandão TRS, Silva CLM. Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review. Am J Infect Control. 2007;35(9):574–81.
41. Nuutinen J, Clerc C, Virta T, Törmälä P. Effect of gamma, ethylene oxide, electron beam, and plasma sterilization on the behaviour of SR-PLLA fibres in vitro. Biomater Sci Polym. 2009;13(12):1325–36.
42. Henry MM, Thompson JN. Cirugía clínica. 5 Ed. Barcelona (España): Masson, S.A.; 2005.
43. Acosta-Gnass SI, Andrade S V. Manual de esterilización para centros de salud. Washington: Organización Panamericana de la Salud; 2008.
44. Guillamas C, Gutiérrez E, Hernando A, Méndez M, Sánchez-Casado G, Tordesillas L. Higiene del medio hospitalario y limpieza de material. Editex; 2017.
45. Roberts RB, Rendell-Baker L. Safe Use of Ethylene Oxide Sterilization in Hospitals. 1962;49(6):919–21.
46. Rutala W a, Gergen MF, Weber DJ. Comparative evaluation of the sporicidal activity of new low-temperature sterilization technologies: Ethylene oxide, 2

- plasma sterilization systems, and liquid peracetic acid. *Am J Infect Control* [Internet]. 1998;26(4):393–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196655398700343>
47. Rutala WA, Weber DJ, Rutala WA, Weber DJ. Temperature Sterilization Technologie Do We Need to Redefine “ Sterilization ”? *SHEA*. 2017;17(2):87–91.
48. López AL. Óxido De Etileno , Utilización Como Agente Esterilizante Y Riesgos Para La Salud Del Personal Sanitario. *CES Salud Pública* [Internet]. 2014;5:154–62. Available from: http://revistas.ces.edu.co/index.php/ces_salud_publica/article/view/3019
49. Farrás MGR, Químico IT. NTP 470 : Óxido de etileno : prevención de la exposición en hospitales.
50. Silindir M, Özer AY. Sterilization methods and the comparison of E-beam sterilization with gamma radiation sterilization. *Fabad J Pharm Sci*. 2009;34(1):43–53.
51. Roos MH, Pawlina W. *Histología: Texto y Atlas correlación con biología molecular y celular*. 7. Edición. Barcelona (España): Wolters Kluwer; 2015. 21 p.
52. Gómez R, Murillo R. *Espectroscopía Infrarroja*. 1892. p. 1–14.
53. Parikh S, Chorover J. Estudio espectroscópico FTIR de la formación de óxido Mn biogénico. *Pseudomonas putida GB-1 Geomicrobiol*. 2005;22:207–18.

54. Chen Y, Zou C, Mastalerz M, Hu S, Gasaway C, Tao X. Applications of micro-fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in the geological sciences—A Review. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):30223–50.
55. Piqué T, Vázquez A. Uso De Espectroscopía Infrarroja Con Transformada De Fourier (Ftir) En El Estudio De La Hidratación Del Cemento. *Concreto y Cem Investig y Desarro* [Internet]. 2012;2:62–71. Available from: <http://www.scielo.org.mx/pdf/ccid/v3n2/v3n2a4.pdf>
56. Ibarra J, Muñoz E, Moliner R. FTIR study of the evolution of coal structure during the coalification process. *Org Geochem* [Internet]. 1996 Jun [cited 2017 Jul 28];24(6–7):725–35. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0146638096000630>
57. Lis GP, Mastalerz M, Schimmelmann A, Lewan MD, Stankiewicz BA. FTIR absorption indices for thermal maturity in comparison with vitrinite reflectance R₀ in type-II kerogens from Devonian black shales. *Org Geochem* [Internet]. 2005 Nov [cited 2017 Jul 28];36(11):1533–52. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146638005001531>
58. Iglesias MJ, Jiménez A, Lsggoun-Défarge F, Suárez-Ruiz I. FTIR study of pure vitrains and associated coals. *Fuel Energy Abstr*. 1995;36(17):243.
59. Li Z, Fredericks PM, Rintoul L, Ward CR. Application of attenuated total reflectance micro-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy to the study of coal macerals: Examples from the Bowen Basin, Australia. *Int J Coal Geol* [Internet]. 2007 Apr [cited 2017 Jul 28];70(1–3):87–94. Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166516206001005>

60. Li Z, Fredericks PM, Ward CR, Rintoul L. Chemical functionalities of high and low sulfur Australian coals: A case study using micro attenuated total reflectance–Fourier transform infrared (ATR–FTIR) spectrometry. *Org Geochem* [Internet]. 2010 Jun [cited 2017 Jul 28];41(6):554–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0146638010000549>
61. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Analysis [Internet]. intertek. [cited 2017 May 24]. Available from: <http://www.intertek.com/analysis/ftir/>
62. Lan X, Huan X, Liang-Bin L, Hsiao BS, Gan-Ji Z, Zhong-Ming L. Biomimetic Nanofibrillation in Two-Component Biopolymer Blends with Structural Analogs to Spider Silk. *Sci Rep*. 2016;6(34572).
63. Duch J, Fuster D. Utilidad de la gammagrafía ósea. *Jano*. 2007;1656:41–5.
64. Matos Pedron L. Gammagrafía con Galio 67 [Internet]. 2016 [cited 2017 May 23]. Available from: <http://www.gamagrafia.com.mx/gammagrafia-con-galio67.html>
65. Farto JCA. Estado actual de los estudios de medicina nuclear en procesos infecciosos e inflamatorios en España. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol*. 2001;20. Núm 5:353–7.
66. CENIEH. Microtomografía computarizada. Centro Nacional de Investigación sobre la Evolución Humana.
67. Ferro Flores G, Arteaga De Murphy C. Estado actual y futuro de la

- gammagrafía SPECT / CT con Radiofármacos de 99m Tc. Rev Investig Clínica. 2007;59(medigraphic):373–81.
68. Camela AS. Evaluación de la degradación in vitro de fibras hiladas de (PLA) y la respuesta inflamatoria en ratas Wistar, para su posible uso en regeneración de tejidos. UNAM; 2017.
69. Ghobeira R, Philips C, Declercq H, Cools P, De Geyter N, Cornelissen R, et al. Effects of different sterilization methods on the physico-chemical and bioresponsive properties of plasma-treated polycaprolactone films. Biomed Mater [Internet]. 2017;12(1):15017. Available from: <http://stacks.iop.org/1748-605X/12/i=1/a=015017?key=crossref.13e380618b57fadb002caa52849eba1f>
70. Broon NJ, Martínez MP, Ramírez ML, Tinajero MC, Lagunas ÁL, Bramante CM. Respuesta inflamatoria de Bioceramic a la implantación de tubos de dentina en tejido sucutáneo de ratas. Rev Odonto Mex. 2016;20(3):174–8.
71. Ochoa L. Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Nom-062-Zoo. 1999;1–58.
72. Norma Oficial Mexicana NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorio de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria. 1995;
73. Norma Oficial Mexicana NOM.033-ZOO-1995, Sacrificio Humintario De Los Animales Domesticos Y Silvestres. 1995;
74. Norma Oficial Mexicana NOM-046-ZOO-1995, Sistema Nacional de Vigilancia

Epizootiologica. 2002;1–10.

75. Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995, Trato humanitario en la movilización de animales. 1995;
76. Bhatnagar D, Dube K, Damodaran VB, Subramanian G, Aston K, Halperin F, et al. Effects of Terminal Sterilization on PEG-Based Bioresorbable Polymers Used in Biomedical Applications. *Macromol Mater Eng*. 2017;301(10):1211–24.

11. Anexos

Documento de recolección de datos para μ SPECT/CT

Estudio: Esterilización de andamios Fecha: 27/03/2017

Nombre	Peso	Dosis	Hora de inyección
Rata 1 PLA 4D	289g	176.5 μ Ci	12:48pm
Rata 2 PLA 4D	253g	177.8 μ Ci	1:00pm
Rata 3 PLA 4D	259g	169 μ Ci	1:12pm

Estudio: Esterilización de andamios Fecha: 03/04/2017

Nombre	Peso	Dosis	Hora de inyección
Rata 1 PLA 10D	292g	244.2 μ Ci	12:50pm
Rata 2 PLA 10D	287g	245.9 μ Ci	1:00pm
Rata 3 PLA 10D	334g	263.4 μ Ci	1:07pm

Estudio: Esterilización de andamios Fecha: 03/04/2017

Nombre	Peso	Dosis	Hora de inyección
Rata 1 PLA 21D	291g	236.4 μ Ci	12:27pm
Rata 2 PLA 21D	336g	239.7 μ Ci	12:19pm
Rata 3 PLA 21D	342g	240.1 μ Ci	12:35pm

Glosario

Absorción: (Lt. Absorptio) 1. Penetración de un líquido en la estructura interna de un sólido y su retención en el interior de este. 2. Captación de líquidos por sólidos, o de gases por sólidos o líquidos.

Andamio: 1. Marco o elemento estructural que mantiene las células o tejidos juntos. 2. Soporte natural o artificial, que mantiene el contorno del tejido.

Autoignición: Inicio de la combustión.

Biocompatible: Es la capacidad de un material para desarrollar una respuesta adecuada en el huésped en una aplicación específica.

Biodegradable: Sustancia u objeto que se puede degradar mediante el accionar de un agente biológico.

Bioingeniería: Ciencia que aplica los métodos de la ingeniería a la resolución de problemas biológicos, mediante la combinación de andamios, células y moléculas biológicamente activas.

Escisión: (Lt. Scissio, corte + onis, división) 1. Extirpación de un órgano o tejido. 2. División, dislocación, fisuración, o desdoblamiento de un órgano o tejido mediante incisión.

Haz: Conjunto de rayos que emiten una fuente de luz.

Locomoción: Acción de trasladarse de un lado a otro.

Módulo elástico: Es un parámetro que caracteriza el comportamiento de un material elástico, según la dirección en la que se aplica una fuerza.

psi: Libra por pulgada cuadrada.

Radionucleido: Un nucleído inestable y que por tanto degenera emitiendo radiaciones ionizantes.

Reticulación: La reticulación es una reacción química mediante el cual los polímeros forman una red tridimensional por la unión de diferentes cadenas poliméricas.

Termosensible: Que sufre cambios en respuesta a la temperatura externa.

Tracción: Acto y consecuencia de tirar de una cosa con el objetivo de desplazarla o de conseguir que se mueva.