



Facultad de Estudios Superiores
IZTACALA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“BIOCOMPATIBILIDAD DE UN CONSTRUCTO TRIDIMENSIONAL DE
PLA PARA SU USO EN INGENIERÍA DE TEJIDOS.”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

ITZEL ARREOLA ESQUIVEL

TUTORA:

DRA. CYNTHIA GEORGINA TREJO IRIARTE

SINODALES:

DR. GERMÁN ISAURO GARRIDO FARIÑA

DR. JOSÉ FRANCISCO GÓMEZ CLAVEL

DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ

MTRO. CRISÓFORO MERCADO MARQUES

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2022



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.

Contenido

AGRADECIMIENTOS	5
Colaboradores	5
Personales.....	6
INTRODUCCIÓN	7
1. La Ingeniería de Tejidos.....	7
2. Ingeniería de Tejidos óseos.	8
3. Biomateriales.....	10
4. Andamios.....	10
5. Ácido Poliláctico (PLA).	12
6. Reacción granulomatosa de los tejidos a los implantes o andamios (cuerpo extraño). ...	13
7. Células troncales mesenquimales.....	18
8. Células troncales mesenquimales de tejido adiposo.	19
9. MSCat diferenciadas a linaje osteogénico (MSCost).....	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
ANTECEDENTES	23
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25
General:	25
Específicos:	25
METODOLOGÍA	26
Diseño del estudio.	27
Extracción de tejido adiposo subcutáneo.	28

Obtención de Células Troncales Mesenquimales de Tejido Adiposo (MSCat).	30
Subcultivos de MSCat.	32
Cuantificación celular con cámara Neubauer.	32
Diferenciación celular al Linaje Osteogénico.	33
Obtención del Andamio de PLA.	34
Preparación de los constructos.	34
Sembrado celular en los andamios de PLA (Constructos).	35
Diseño quirúrgico de implantación subdérmica.	36
Implantación subdérmica.	37
Procesamiento de la muestra control de inflamación.	39
Procesamiento de la muestra para Histología.	40
Tinción de Hematoxilina y Eosina H&E.	42
Tinción de Tricrómico de Masson.	44
RESULTADOS	45
1. Control inflamación 21 y 60 días.	45
2. Sacrificios 21 y 60 días.	52
3. Resultados Histológicos H & E.	54
GELFOAM 21D	55
GELFOAM 60D	56
PLA 21D	57
PLA 60D	58
PLA + MSCAT 21D	59
PLA + MSCAT 60D	60
PLA + MSCOST 21D.....	61
PLA + MSCOST 60D.....	62
4. Resultados Histológicos Tricrómico de Masson.	64

GELFOAM 21D	65
GELFOAM 60D	66
PLA 21D	67
PLA 60D	68
PLA + MSCAT 21D	69
PLA + MSCAT 60D	70
PLA + MSCOST 21D.....	71
PLA + MSCOST 60D.....	72
DISCUSIÓN	74
CONCLUSIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	78
Bibliografía Figuras:.....	81
ANEXOS	82
1. Aval de comisión de ética.	82
2. Aval de comisión de bioseguridad.	83
3. Tabla de registros de inflamación 60 días. (PLA, PLA + MSCat, PLA + MSCost, Gelfoam).	84
4. Tabla de registro de inflamación 21 días. (PLA, PLA + MSCat, PLA + MSCost, Gelfoam).	85
5. Cartel XL Congreso Mexicano y VII Iberoamericano de Histología 2020.	86
6. Constancia de participación XL Congreso Mexicano y VII Iberoamericano de Histología 2020.	87
7. Participación con video de difusión en el XXXIX coloquio de investigación de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala 2021.	88
8. Constancia de participación en el II Congreso Nacional de Biomateriales de la Universidad de Antioquia 2021.	89

AGRADECIMIENTOS

Colaboradores

Agradezco el apoyo incondicional por parte de la Dra. Cynthia Trejo Iriarte integrante del LIO (Laboratorio de Investigación en Odontología) perteneciente a la FES Iztacala, quien me impulso a tomar una estancia en la Universidad Complutense de Madrid, donde aprendí los principios básicos de la Investigación lo cual me ayudó bastante al momento de iniciar con mi tesis, por todos los conocimientos otorgados durante la licenciatura y al termino de mi carrera profesional dándome la oportunidad de ser parte de su grupo de Investigación (GICTIT).

Dr. Germán Isauro Garrido Fariña, responsable del Laboratorio de Apoyo a la Histología y Biología, perteneciente a la FES Cuautitlán campo 4, agradezco el apoyo brindado en la realización de esta tesis, por el tiempo y paciencia de compartirme nuevos conocimientos acerca de la Histología, así como siempre entender principios básicos para comprender un todo. Admiro mucho su dedicación y pasión.

Mtro. Crisóforo Mercado Márquez responsable de la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la FES Cuautitlán campo 4, agradezco el apoyo de las ratas Wistar, así como con el espacio para la realización de los procedimientos quirúrgicos, su paciencia y dedicación para mantener un área ideal para realizar cualquier tipo de procedimiento y resolver todas mis dudas.

Dr. José Francisco Gómez Clavel perteneciente al Laboratorio de Investigación en Educación y Odontología, agradezco su tiempo para revisar y orientarme en mejorar este trabajo.

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez, perteneciente al Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología de la UNAM, agradezco haberme brindado el biomaterial (PLA), así como conocer su equipo de trabajo y laboratorio.

Personales

Agradezco a mis padres por haberme brindado la oportunidad de estudiar una Licenciatura, su apoyo incondicional desde el inicio hasta el termino de ella, por su paciencia y dedicación y por haberme formado con estos principios y ser la persona que hoy en día soy.

A mi hermana la cual me apoyo en momentos difíciles durante la licenciatura.

A mis abuelitos los cuales sé que están muy orgullosos de mí porque siempre me impulsaron a seguir adelante, nunca rendirme y dar siempre lo mejor de mí en cada momento.

A mi familia la cual me apoyo durante mi formación académica.

A mis compañeros de GICTIT, los cuales me enseñaron y guiaron durante la realización de este trabajo, aprendí muchísimo de ellos.

“PLANTA TUS SUEÑOS Y DEJALOS CRECER.”

INTRODUCCIÓN

1. La Ingeniería de Tejidos.

La Ingeniería de Tejidos, **(IT)** es un campo interdisciplinario, debido al uso de los principios y métodos de la Ingeniería, la Biología y la Bioquímica, orientados a la comprensión de la estructura y función de tejidos normales y patológicos, teniendo una aplicación de estrategias terapéuticas biológicas, las cuales tienen como propósito reemplazar, reparar, mantener y/o mejorar la función tisular. Algunos de los elementos de la IT son: las células madre o troncales (Stem Cells), moléculas de señalización y los andamios (scaffolds) (Muñoz, 2020) (FIGURA 1).

El objetivo de la IT es el diseño y obtención de tejidos, que imitan las características de los tejidos naturales actuando como guía para el crecimiento de nuevos tejidos, permitiendo que las células cercanas continúen con el proceso de reparación o regeneración (Perán, 2013).

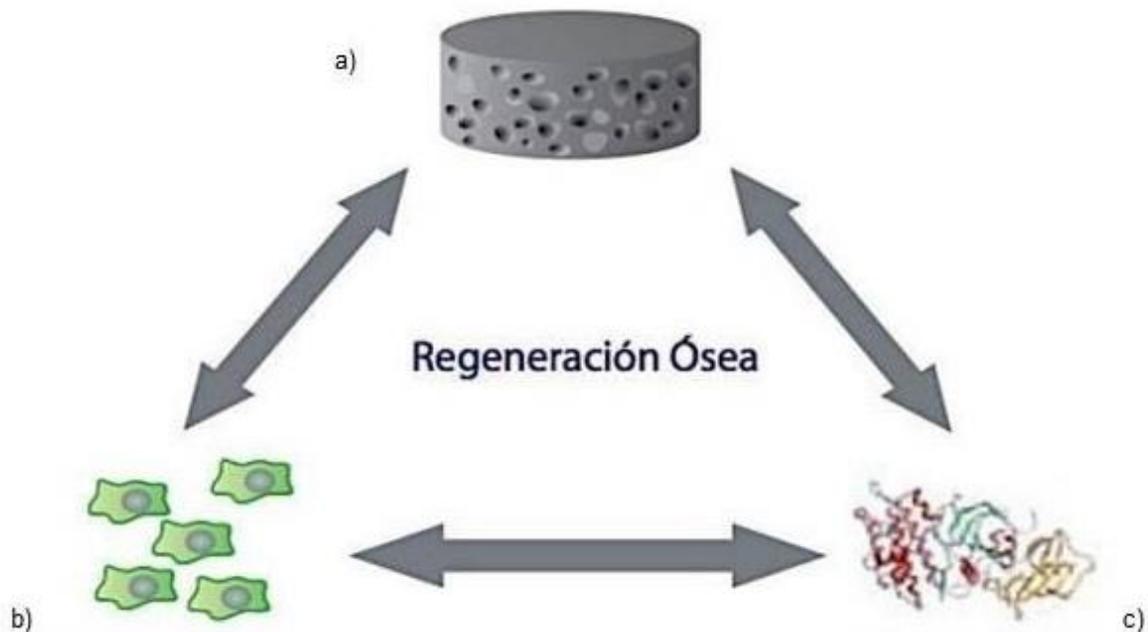


FIGURA 1: Triada de Ingeniería de Tejidos. a) Matriz Tridimensional (andamio), b) Células mesenquimales MSCat, c) Moléculas de señalización. (Imagen modificada de Alvarez JF, Osseous Regeneration through Tissue Engineering an introduction, 2009) (Alvarez, 2009).

2. Ingeniería de Tejidos óseos.

La Ingeniería de Tejidos Óseos (**ITO**) tiene como objetivo diseñar constructos tridimensionales que actúen como una matriz extracelular, osteoconductora y osteoinductora, que permita rellenar el espacio que dejó el tejido dañado hasta que este sea regenerado por completo, teniendo como su principal función servir como guía para el crecimiento de nuevos tejidos a fin de devolverles su forma y función; la ITO han demostrado ser una alternativa eficaz en el trasplante de órganos (Melek, 2015) (Shen, 2016)

Cuando se lleva a cabo la regeneración ósea debemos tener en cuenta los siguientes conceptos: (FIGURA 2).

- 1) La **osteogénesis** es la síntesis de hueso nuevo a partir de células derivadas del injerto o del huésped. Requiere células capaces de generar hueso (Barón, 2016).
- 2) La **osteoinducción**, definida por Raspall y cols (Raspall, 2006), es la transformación de las células mesenquimales indiferenciadas de la zona receptora, en células osteoformadoras, para comenzar con el proceso de osteogénesis.
- 3) La **osteoconducción** se define como el proceso en el que tiene lugar el crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular y células mesenquimales, desde la zona receptora del huésped hacia el injerto, permitiendo la formación de hueso (Whang, 2003)

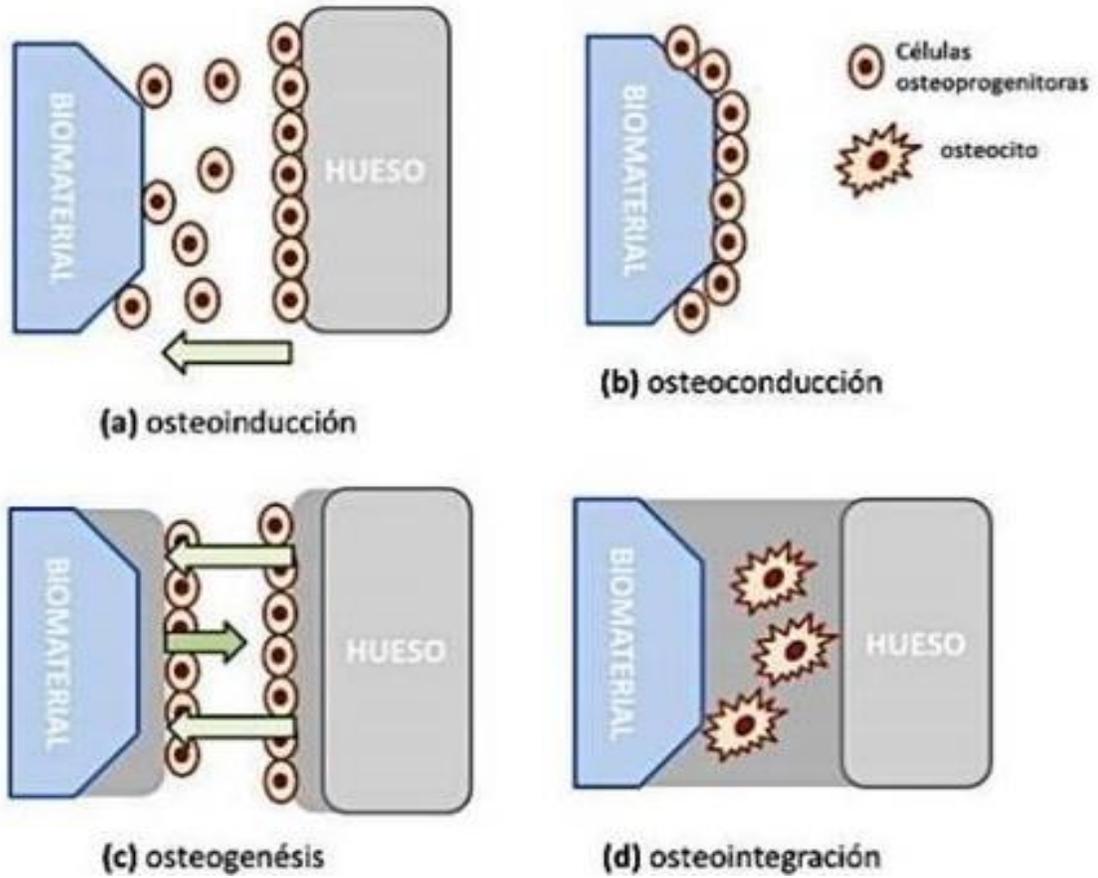


FIGURA 2: Esquema de los procesos celulares que tienen lugar cuando se implanta un biomaterial en un organismo (Imagen modificada de Fernández Moraleda Belén, Optimización de materiales para regeneración ósea. Estudio de las interacciones de hidroxiapatita con proteínas y preparación de andamios porosos, Universidad Complutense de Madrid, 2013) (Férmendez,2013).

3. Biomateriales.

Son materiales que pueden estar en contacto con fluidos y tejidos biológicos y ser tolerados adecuadamente y al mismo tiempo proveen a los tejidos de la estructura ideal para dar alojamiento a nuevas células implantadas y residentes, y así contribuir a la formación de tejido nuevo, estos materiales deben ser biocompatibles, es decir, tener la cualidad de no inducir efectos citotóxicos al organismo (Estrada, 2020)

Su uso como andamios, es la opción equivalente al uso de los autoinjertos, donde el tejido es obtenido del mismo individuo y éste actúa como donante receptor (Soto, 2004)

4. Andamios.

Los andamios sirven de soporte a las células para que proliferen y se diferencien, por lo tanto, su diseño y desarrollo debe considerar diferentes factores biológicos, químicos y físicos. La arquitectura de los andamios requiere de un diseño que les permita a las células realizar el proceso de regeneración tisular; para ello, el andamio ideal debe tener 4 características fundamentales: (Tajbakhsh, 2017) (Shen, 2016)

- 1) Ser tridimensional y tener estructura altamente porosa con una red interconectada de poros para el crecimiento celular, el flujo y transporte de nutrientes, así como de residuos metabólicos.
- 2) Ser biocompatible y bioabsorbible con una tasa de degradación controlable.
- 3) Poseer una superficie bioquímica adecuada para la fijación, la proliferación y la diferenciación celular; y que sus desechos o productos de su degradación no dañen al organismo.
- 4) Tener propiedades mecánicas adecuadas de acuerdo al sitio en donde será implantado.

La principal característica de un andamio es que debe ser **biocompatible**; es decir, debe promover la adhesión celular, la vascularización, el suministro de nutrientes y oxígeno a las células, y también apoyar la actividad celular normal, incluidos los sistemas de señalización molecular.

Entre los diferentes tipos de andamios que hay actualmente, los más empleados son polímeros naturales o sintéticos debido a que se comportan como un andamiaje clínicamente útil para un tejido u órgano diana. Los polímeros naturales más utilizados son: la matriz ósea desmineralizada, agarosa, colágeno, alginato, entre otros; y los polímeros sintéticos como poliésteres degradables, tales como: ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-láctico (PLA) y sus copolímeros, poli (D, L -lactida-coglicólico (PLGA) y caprolactona (PLC) (Perán, 2013).

Después de la implantación, el andamio no debe provocar respuestas locales o sistémicas indeseables como: citotoxicidad (propiedad de ciertas sustancias o células de dañar a otras células), genotoxicidad (capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, originando efectos biológicos adversos), inmunogenicidad (capacidad que tiene un antígeno de activar el sistema inmunitario e inducir una respuesta inmune), mutagenicidad (alteraciones del material genético celular), siendo algunos de los efectos indeseables que pueden ocasionar inflamación crónica y causar un rechazo de un cuerpo extraño. (Monroy, 2005)

Asimismo, el ritmo de degradación debe calcularse de tal manera que proporcione soporte estructural necesario permitiendo que las células logren colonizar, al mismo tiempo que se realiza su degradación gradual, y que sus desechos no sean tóxicos ni alteren a los tejidos.

Los andamios, junto con las células y las moléculas o factores de crecimiento, forman un **constructo** con el objetivo de fomentar la osteoconducción (andamio), osteogénesis (aporte de las células) y osteoinducción (señales del microambiente y citoquinas).

5. Ácido Poliláctico (PLA).

El **PLA** es un poliéster termoplástico biodegradable, no tóxico, no cancerígeno para el cuerpo humano producido a partir de recursos renovables, y que fue aprobado por la Food and Drugs Administration (FDA) en 1970, para sus múltiples aplicaciones biomédicas tales como: dispositivos médicos, suturas reabsorbibles, materiales de fijación biodegradable, etc. (Tsou, 2015)

Posee 2 estereoisómeros: ácido L + láctico y el ácido D-láctico, los dos isómeros son componentes necesarios para la síntesis del PLA. La diferencia entre estos dos, es la configuración L+ que es metabolizada por el tejido humano y se hidroliza en metabolitos biocompatibles, por ello, es el isómero más empleado en la fabricación de dispositivos médicos. Es un ácido orgánico de origen natural, obtenido del ácido láctico, que se obtiene como producto de la fermentación del almidón de plantas como: maíz, caña de azúcar, papas, etc.

La degradación del PLA se produce principalmente por hidrólisis, después de varios meses de exposición a la humedad. El PLA puede degradarse desde 10 meses hasta 4 años dependiendo de los factores del microambiente que lo rodee (Granados, 2017)

La técnica de electrohilado o electrospinning permite la creación de nano-fibras a través de un flujo de solución polimérica eléctricamente cargada, imitando así la matriz extracelular (Granados, 2017)

De acuerdo a Tajbakhsh, 2017 el PLA debe de cumplir con ciertas características como:

- Ser biocompatible y bioabsorbible.
- Tridimensional y poroso en su estructura para el crecimiento celular
- Superficie químicamente adecuada para para fijación celular y diferenciación.
- Propiedades mecánicas adecuadas que coincidan con las de los tejidos del sitio de la implantación.

6. Reacción granulomatosa de los tejidos a los implantes o andamios (cuerpo extraño).

Las propiedades del biomaterial como su rigidez, porosidad, carga y las características de su superficie provocan señales microambientales que alteran el comportamiento celular, en particular el de las células inmunitarias innatas (Lynch,2022). Por lo ello, la comprensión de los mecanismos por los que los biomateriales pueden modular la respuesta inmune para el estudio de los biomateriales.

Al verse alterado el microambiente por un agente (el biomaterial) exógeno, orgánico o inorgánico que cruza la primera barrera de defensa puede provocar una respuesta inflamatoria, con el fin de prevenir daño en los tejidos circundantes, para aislar y eliminar el agente extraño, la respuesta tisular forma un granuloma a partir de la respuesta inmune innata (López, 2016) (FIGURA 3).

Cuando ocurre un daño a los tejidos se produce en cuatro fases superpuestas; hemostasia, la etapa inflamatoria, la etapa proliferativa y la etapa de remodelación.). La desregulación en cualquier etapa de este proceso puede resultar en una alteración de la reparación y en que no se lleve a cabo de manera exitosa la regeneración. Cuando pasan más de tres meses y una herida se encuentra aún abierta se dice que son heridas crónicas, y estas son el resultado de la falta de transición de la fase altamente inflamatoria a la fase regenerativa de cicatrización. Los biomateriales implantados son, por definición, cuerpos extraños por ello, se debe limitar la respuesta inflamatoria que provocan como: aumento de la inflamación, encapsulación fibrosa, rechazo del implante y respuesta a cuerpo extraño, que es cuando el huésped responde de manera aberrante al biomaterial.

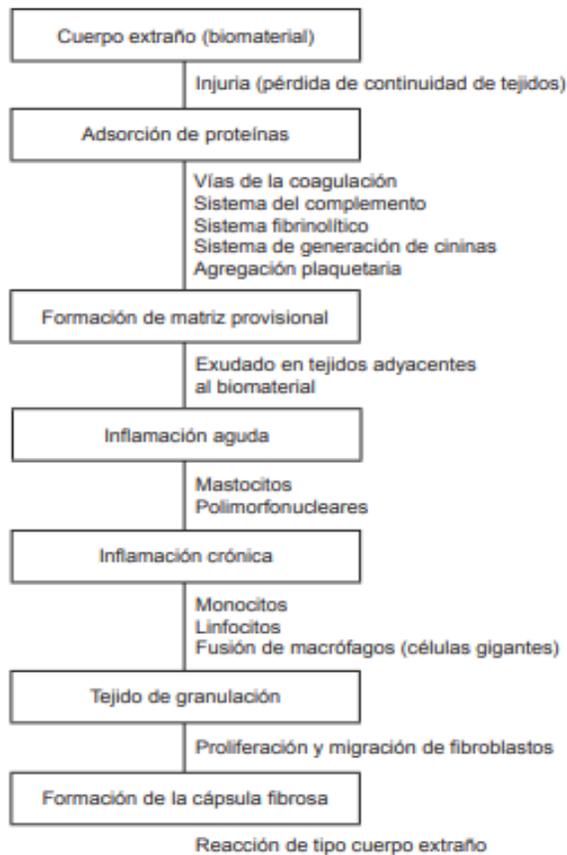


FIGURA 3: Esquema de los eventos que constituyen la reacción de tipo cuerpo extraño (Modificado de Anderson, 2001).

El proceso de la reacción a cuerpo extraño en el caso de biomateriales se compone de: (FIGURA 4)

1. **Adsorción de proteínas:** Debido a la respuesta inflamatoria que se activa por la lesión de la vasculatura presente en los tejidos conectivos subcutáneos, la sangre se extravasa hacia los tejidos perivasculares, y se activan los siguientes procesos: (López, 2016)
 - a) Las vías de la coagulación.
 - b) El sistema del complemento.
 - c) El sistema fibrinolítico.

- d) El sistema de generación de cininas.
- e) La agregación plaquetaria.

2. **Formación de la matriz provisional:** A diferencia de la respuesta inflamatoria crónica (se explica más adelante), después de la lesión en el tejido conectivo durante la implantación, la alteración de la solución de continuidad del lecho tisular y vascular conduce al inmediato desarrollo de una matriz provisional en el lugar de la implantación del biomaterial. La cual consiste en la agregación de fibrina por activación de la cascada de coagulación y los productos pro-inflamatorios liberados por el sistema de complemento, iniciando los procesos de reparación tisular a partir de la agregación plaquetaria. Con el objetivo de amplificar la respuesta inflamatoria, y estabilizar estructural y bioquímicamente el proceso de cicatrización de la herida junto con fibronectina, trombospondina, factores mitógenos, factores quimiotácticos y citoquinas pro-inflamatorias (López, 2016) crean una matriz extracelular sintetizada por fibroblastos, abundantes vasos sanguíneos y macrófagos. Al frustrarse la fagocitosis en la etapa de la inflamación aguda, luego por parte de los macrófagos en la inflamación crónica, los macrófagos dan lugar a células gigantes.

- **Respuesta inflamatoria aguda:** Su duración es relativamente corta desde unos minutos a pocos días. Comienza en el momento en que el biomaterial es implantado por el daño estructural del colágeno tipo IV de la matriz extracelular, se da el sangrado inicial, la formación del coágulo, el edema (exudado de líquido y proteínas plasmáticas) y la migración leucocitaria (neutrófilos y monocitos), como parte de un proceso de cicatrización en la proximidad del sitio de la lesión (López, C.,2016). Una vez constituida la matriz provisional, se da la migración leucocitaria hacia los tejidos alrededor del implante o biomaterial lo que es regulado por selectinas, integrinas, citoquinas y metaloproteasas entre otros. Los neutrófilos se hacia el sitio del daño o donde se colocó el biomaterial para iniciar la fagocitosis, que es el

proceso en el que el neutrófilo, macrófago o las células dendríticas, endocitan el antígeno en una vesícula denominada fagosoma, el cual se fusiona con los lisosomas para constituir la fagolisosoma y destruir al microorganismo por medio de las enzimas lisosomales. Al final de este proceso las células mueren por apoptosis. Pero cuando el antígeno resulta es un material extraño más grande que la célula no ocurre la fagocitosis, y este proceso lo han denominado como: fagocitosis frustrada, entonces, las células segregan enzimas que pueden generar daño tisular, lo que establece la inflamación crónica (Medin,2016.).

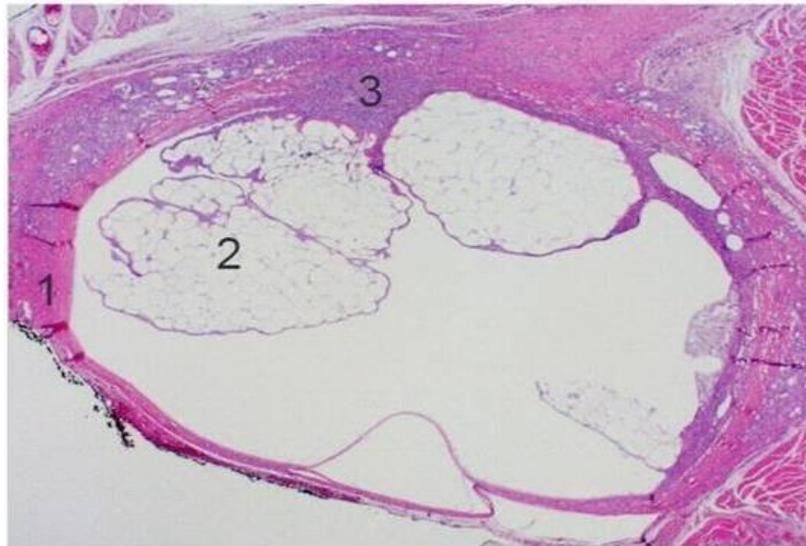
- **Respuesta inflamatoria crónica:** Es de larga duración (varios días), y está limitada a los tejidos adyacentes al biomaterial implantado. Su desarrollo histológico se caracteriza por la presencia de monocitos, macrófagos, células plasmáticas, linfocitos y células gigantes en la interface entre los biomateriales y los tejidos; y se da la proliferación de fibroblastos, angiogénesis, y por último, la formación de un tejido granulomatoso.
- **Formación del tejido de granulación:** Se conforma un tejido de cicatrización (precursor de la cápsula fibrosa) caracterizado por la persistencia de la angiogénesis, la presencia de macrófagos y la infiltración de fibroblastos (con fenotipo de células de músculo liso o miofibroblastos) para síntesis de los componentes de la matriz extracelular y regulación de la contracción de la lesión.

Este tejido de cicatrización marca el comienzo de la resolución luego de tres a cinco días de la respuesta inflamatoria, y la posterior cicatrización dependerá de la intensidad y magnitud de la respuesta inflamatoria ante el implante del biomaterial.

En el caso de biomateriales no reabsorbibles o que no se hayan reabsorbido exitosamente, la cicatrización final no ocurre debido a que la respuesta de tipo cuerpo extraño se perpetúa, lo que ocasiona que en el tejido de granulación los macrófagos activados diferencien su fenotipo a células

epitelioides que se fusionan entre sí para constituir células gigantes de tipo cuerpo extraño, las cuales rodean al biomaterial para constituir un granuloma (Medina,2016).

- **Conformación de la cápsula fibrosa:** Es la última respuesta del proceso de cicatrización ante una lesión ocasionada por la implantación subcutánea de un biomaterial. Ante la incapacidad local del organismo de fagocitar o degradar los biomateriales inoculados, estos últimos son encapsulados para así, aislarlos de los diversos factores que generan respuestas inflamatorias y dar paso a un proceso reparativo de los tejidos epiteliales y conectivos afectados (López, 2016)



- **FIGURA 4:** Preparación histológica en hematoxilina-eosina a 10X de un granuloma de tipo cuerpo extraño por inyección de Restylane® (ácido hialurónico) en la región oral. 1. Cápsula de tejido conectivo denso irregular; 2. Áreas vacuolares quísticas compatibles con el espacio que ocupaba el material biocompatible; 3. Zonas de infiltrado de mononucleares. (Modificado de Edwards PC y Fantasia JE, 2004). (Edwards,2007).

7. Células troncales mesenquimales.

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, International Society for Cellular Therapy) ha propuesto tres criterios para la caracterización “*in vitro*” de las Células Troncales Mesenquimales (MSC), estos son (Rodríguez-Pardo, 2010):

- 1) Demostrar el aislamiento de células con morfología fibroblastoide de tipo adherente “*in vitro*”.
- 2) Determinar la expresión de los antígenos: CD105, CD73 y CD90, y la ausencia de marcadores hematopoyéticos: CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19 y HLA-DR.
- 3) Inducir la diferenciación “*in vitro*” de las MSC en osteoblastos, adipoblastos y condroblastos.

Las células troncales tienen la capacidad de inhibir la respuesta inmune, suprimiendo la proliferación de linfocitos T, alterando la capacidad de presentación antigénica (Miranda Rodríguez A., 2014). Se ha demostrado que las MSC secretan una gran cantidad de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, que permiten su migración y expansión, ejercen actividades inmunomoduladoras, modulan la angiogénesis y la apoptosis (Gebler, 2011)

Las fuentes de obtención de MSC son tejidos originarios del mesodermo: médula ósea, hueso trabecular, líquido sinovial, cartílago, tejido graso, así como órganos provenientes del endodermo (timo, hígado) y del ectodermo (piel, folículo piloso, duramadre y pulpa dental) (Miron, 2012). Las MSC son células capaces de autorrenovarse y diferenciarse a linajes como (Linero, 2014): osteogénico, condrogénico, adipogénico, etc. Aunque su capacidad de diferenciarse a células de origen no mesenquimal se ha demostrado diferenciándolas a tejido nervioso (Abdanipour, 2011) y muscular (Lee, 2021). Las células troncales deben presentar, la capacidad de adhesión y autorreplicación, así como la capacidad inmunomoduladora.

8. Células troncales mesenquimales de tejido adiposo.

Las células troncales mesenquimales adultas derivadas de tejido adiposo que denominaremos: MSCat (Adipose tissue-derived stem cells (ADSCs)), se caracterizan por su habilidad para auto-renovarse y diferenciarse en múltiples linajes celulares, pluripotencialidad (capacidad de diferenciación) y alta tasa de proliferación, inmunomoduladoras y plasticidad (Meruane , 2011).

Además, el tejido adiposo subcutáneo es un tejido abundante, de fácil obtención y mediante su extracción por métodos poco invasivos (como liposucciones) y sus MSCat son altamente inducibles al linaje osteogénico (Yamachika, 2013).

Las MSCat son células que han demostrado que poseen un alto potencial osteogénico a nivel ectópico y ortotópico. Se ha investigado que las MSCat se pueden utilizar para su implantación en andamios para la regeneración ósea, ya que se aíslan fácilmente en comparación con otras fuentes celulares (Alvarez, 2009).

Martínez y cols, evaluaron la capacidad y eficacia de las MSCat para diferenciarse en hueso o cartílago, concluyendo que los resultados encontrados han sido positivos cuando se utilizan en combinación con injertos, andamios y factores que inducen su osteodiferenciación (Álvarez, 2018)

9. MSCat diferenciadas a linaje osteogénico (MSCost).

La transformación de MSCat a la estirpe ósea (MSCost) es un proceso altamente programado que consta de varias etapas: la proliferación, la diferenciación, la deposición de matriz, la mineralización y la maduración de la matriz. El protocolo general para la diferenciación hacia el linaje osteogénico *in vitro* implica el cultivo en monocapa de MSCat en un medio que contiene: dexametasona, β -glicerol-fosfato y ácido ascórbico, durante un periodo de dos a cuatro semanas.

La dexametasona es un glucocorticoide sintético que estimula la proliferación de las MSCs y es esencial para su diferenciación osteogénica, la concentración óptima de esta molécula para la diferenciación ósea en MSCs se ha establecido es de 10 nM, lo que corresponde a concentraciones fisiológicas adecuadas (Walsh, 2001).

El fosfato orgánico, liberado después de hidrólisis enzimática de la beta glicerol-fosfato juega un papel importante en la mineralización de la matriz. Este fosfato libre se aplica, generalmente, en concentraciones de 5-10 mM para la diferenciación ósea de MSCs. El ácido ascórbico es necesario para la hidroxilación de la prolina y la lisina durante la síntesis de Colágeno tipo 1 en la matriz extracelular (Yamachika, 2013).

Las MSCat cultivadas en presencia de estos factores expresan genes y proteínas asociadas con el fenotipo de los osteoblastos, que incluyen la expresión de: fosfatasa alcalina (ALP), colágeno tipo I (Col 1), Osteopontina (Op), Osteonectina (On), Osteocalcina (Oc), Runx2, Osterix (Osx), Proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2), BMP-4 y receptores BMP I y II. Además, cuando se cultivan entre 14 y 28 días *in vitro* en medio osteogénico, las MSCat comienzan a producir mineral de fosfato de calcio dentro de su matriz extracelular, que son mineralizaciones de la matriz, que pueden detectarse mediante tinción con rojo de alizarina o von Kossa. Es importante destacar que las MSCat sometidas a inducción osteogénica son capaces de adherirse a andamios, migrar, proliferar y diferenciarse cuando se trasplantan a tejido óseo *in vivo* (Hu, 2018).

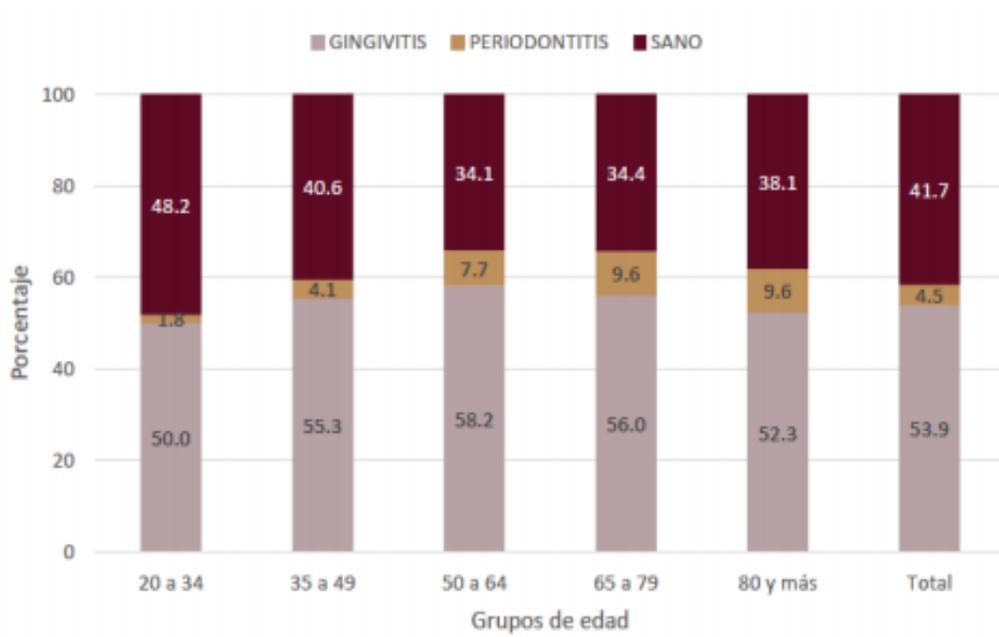
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Este estudio es parte de un esfuerzo más amplio para promover la regeneración ósea con el uso de estrategias de la Ingeniería de tejidos, por ello en todo momento buscamos que pueda ser traslacional al ser humano.

Esta tesis aporta claridad de conocimientos sobre la biocompatibilidad del PLA, cuando es puesto en contacto directo con los tejidos y fluidos biológicos

El constructo que evaluamos está constituido por PLA y MSCost, que son MSCat diferenciadas al linaje osteogénico y que tienen el potencial de crear tejido óseo; ya que previamente ha sido demostrado que las MSCs tienen el potencial no solo de promover la osteogénesis, también, la angiogénesis, siendo una estrategia útil para la regeneración ósea, por ello, debe ser probado, a fin de determinar su potencial osteogénico de manera segura.

De acuerdo al Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales del 2019 (SIVEPAB), se observa que la prevalencia de gingivitis es mayor al 50% en todos los grupos de edad, de acuerdo al registro obtenido considerando que la gingivitis es una enfermedad periodontal persistente en la población mexicana y que si esta no es atendida progresa a periodontitis causando pérdida dental y a consecuencia de esta, la pérdida de hueso alveolar; es así como la periodontitis, se encuentra entre las principales causas de pérdida de los tejidos óseos en la cavidad bucal, aunque no la única, pues las lesiones neoplásicas, traumatismos, entre otras también causan la pérdida de este tejido y es de interés, para los Cirujanos Dentistas y especialistas del área en encontrar nuevas terapias que nos puedan ayudar a paliar con este problema, pues en estos pacientes con pérdida ósea hay pérdida no solo de la función sino también de la estética, lo que disminuye su salud y su autoestima (FIGURA 5).



Fuente: México/SSA/SPPS/DGE/DIE/SIVEPAB 2019

FIGURA 5: Gráfica obtenida de SIVEPAB 2019 (SIVEPAB,2019)

ANTECEDENTES

Ahuja y cols en 2020 (Ahuja, 2020) tuvieron como objetivo medir la respuesta de curación del tejido de curación cuando se emplea la inclusión de PCL y magnesio para modificar el PLA, para saberlo realizaron un análisis de citocinas y un estudio histopatológico de células inflamatorias y formación de colágeno. Emplearon 18 ratas que dividieron en grupos: 6 experimentales, un grupo control y un grupo sham (simulado), a las que les implantaron subcutáneamente debajo de la piel lateral del dorso del animal secciones de 7 mm de longitud de tubos poliméricos dos para provocar la respuesta del tejido de curación e iniciar la biorreabsorción del polímero, analizaron la expresión de las citocinas: Las citocinas IL6, TNF alfa e IL-1Beta se estimaron en el tejido periimplantario, lo que mostró una diferencia no significativa entre los animales no implantados y los que contenían PLA a las 8 semanas, lo que habla de la naturaleza benigna de PLA como un biomaterial de implante. Ambos materiales modificados habían aumentado los recuentos de macrófagos y los niveles de citoquinas, excepto IL6 a las 8 semanas. La vascularización solo a las 8 semanas en tejido que contenía PLA PCL fue significativamente mayor que PLA, que puede controlarse junto con la hidrofobicidad del material para posibles esfuerzos hacia la angiogénesis terapéutica, además, midieron el grosor de la cápsula en preparaciones teñidas con hematoxilina y eosina y tricrómico de Masson, y no encontraron diferencias entre los materiales implantados, incluido el PLA. Concluyendo que el PLA puro y las modificaciones con PCL y Mg no mostraron indicios de rechazo después de 8 semanas de estudio en este modelo subcutáneo en rata. Que los biomateriales modificados tienen una respuesta inflamatoria significativamente mayor en comparación con los biomateriales de PLA puro a las 8 semanas, y que los biomateriales poliméricos como el PLA pueden inducir angiogénesis local / *in situ* y resultar muy útiles para realizar tratamientos basados en el principio de la angiogénesis terapéutica.

K. T. Shalumon y cols en 2012 (Shalumon, 2012) realizaron un estudio donde se mezcló poli (ácido láctico) (PLA) con quitosano (CS) para fabricar PLA-CS electrohilado en nanofibras. Confirmaron que el biomaterial con nanofibras PLA-CS

tienen una mejor degradación que las fibras de PLA. Los estudios con fibroblastos dérmicos humanos (HDF) mostraron la orientación de las células a lo largo de la dirección de alineación de fibras. Los resultados indican que las nanofibras alineadas en el biomaterial de PLA-CS son materiales prometedores para la Ingeniería de tejidos.

Hao y cols en 2010 (Hao, 2010) probaron la eficacia de las células mesenquimales derivadas del tejido adiposo (ADSCs) para inducir osteogénesis, para ello, utilizaron 25 conejos a los que les realizaron un defecto óseo en el radio de 2.5 cm de diámetro en donde se implantaron diferentes andamios, que dividieron en 3 grupos de estudio: grupo 1 (n=6) PLA con hidroxiapatita (nHA) con rASCs transfectadas con la proteína morfogénica ósea humana 2 (hBMP2). En el grupo 2 (n=6) PLA con nHA y RHLC (colágeno de tipo humano recombinante) sembrados con rASC no transfectadas. Y grupo 3 (n=4) PLA/nHA/RHLC. Después de 12 semanas, que duró el estudio observaron que el defecto óseo reparó mejor en el grupo 1, mientras que en el grupo 3 no se observó reparación; por ello, concluyeron que tras la transfección de las rASC con hBMP2, se mejoró la osteogénesis, el hueso fue reconstruido, la remodelación ósea fue terminada, y el andamio se degradó completamente.

Lu y cols (Lu, 2014) examinaron la adhesión, crecimiento y diferenciación de ADSCs en andamios 3D compuestos de PDLLA (espumas porosas de ácido poli-DL-láctico) y Bioglass, *in vitro* e *in vivo* para evaluar sus propiedades potenciales en la ITO. Utilizaron 12 ratones machos inmunodeficientes (MF-1/nu/un). ADSC humanas fueron sembradas para cada andamio (n = 4): 0%, 5% y 40% Bioglass en PDLLA durante 24 h. Se implantaron los andamios en los ratones por medio de un trasplante intraperitoneal con cámaras de difusión. En los experimentos *in vivo* el tiempo de estudio fue de 8 semanas. En sus resultados observaron que los andamios de PDLLA/bioglass con ADSCs presentaron una mayor formación de colágeno y mayor proliferación de células osteogénicas, en comparación con los andamios sin ADSCs.

HIPÓTESIS

Los constructos de andamios de PLA sembrados con células MSCat diferenciadas al linaje osteogénico (MSCost), sí serán biocompatibles en el tejido subcutáneo en nuestro modelo *in vivo*.

OBJETIVOS

General:

- Evaluar la biocompatibilidad de un constructo tridimensional de PLA sembrado con MSCost.

Específicos:

- Determinar el grado de inflamación y compatibilidad de los constructos con los tejidos de nuestro modelo.
- Observar la biodegradabilidad del constructo en los tejidos donde fue implantado a los 21 y 60 días.

METODOLOGÍA

Todos los procedimientos para la realización de esta tesis fueron avalados por las comisiones de la FES Iztacala: Comisión de ética oficio: CE/FESI/112019/1333 la Comisión de bioseguridad con folio #105.

Para este estudio experimental *in vivo* se emplearon 40 ratas de ambos sexos de la cepa *Wistar* de un peso de entre 200+/-50g. Durante la realización del estudio los especímenes tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum* durante todos los procedimientos y con ciclos 12:12 de luz/obscuridad. Su cuidado se realizó en el Bioterio CICUAE de la FES Cuautitlán en donde tuvieron un estricto trato y cuidado de acuerdo a la "NORMA Oficial Mexicana NOM-062- ZOO-1999". Los animales empleados fueron anestesiados con Pentobarbital sódico (43 mg/kg) y Xilazina (7 mg/kg) de acuerdo a la NOM-062- ZOO-1999 en el punto 8 en lo referente a analgesia y anestesia. La eutanasia se realizó por sobre exposición de CO² a fin de evitar el dolor innecesario de acuerdo a la NOM-062- ZOO-1999 en el punto 9. Los cadáveres, así como todos los desechos creados se manejaron cuidadosamente de acuerdo a la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002 y de acuerdo a las guías técnicas de la comisión de Bioseguridad de la FESI.

Diseño del estudio.

Se emplearon 20 ratas Wistar macho 200+/- 50 gr de peso y 20 ratas Wistar hembra 200+/- 50 gr de peso divididas en los siguientes grupos de estudio (n=40)(TABLA 1).

GRUPOS	TIEMPO DE ESTUDIO			
	21 días (n=20)		60 días (n=20)	
	GÉNERO			
	HEMBRAS (n=10)	MACHOS (n=10)	HEMBRAS (n=10)	MACHOS (n=10)
<i>PLA</i>	IMPLANTE SUBDÉRMICO EN LA PARTE INFERIOR DERECHA			
<i>PLA + MSCat</i>	IMPLANTE SUBDÉRMICO EN LA PARTE SUPERIOR IZQUIERDA			
<i>PLA + MSCost</i>	IMPLANTE SUBDÉRMICO EN LA PARTE SUPERIOR DERECHA			
<i>GELFOAM</i>	IMPLANTE SUBDÉRMICO EN LA PARTE INFERIOR IZQUIERDA			

TABLA 1: Diseño de estudio, distribución de grupos, género y tiempo.

Extracción de tejido adiposo subcutáneo.

Para la extracción de tejido adiposo subcutáneo, los especímenes fueron pesados con una báscula digital y anestesiados vía intraperitoneal con: Sedalphorte® (Pentobarbital sódico, 43 mg/kg) y relajante muscular de PROCIN® (Xilazina, 7mg/kg).

El área quirúrgica fue rasurada y se realizó antisepsia con solución Antibenzil®, posteriormente con un mango de bisturí número 3 y una hoja de bisturí número 15 se realizó una incisión cutánea en la zona abdominal del espécimen en una sola intención de 2.5 cm de longitud aproximadamente, con el fin de exponer el tejido adiposo subcutáneo abdominal e inguinal, con las pinzas mosco se realizó la disección roma extrayendo la mayor cantidad posible de tejido adiposo, sin dañar otras estructuras. Al separar y obtener la muestra se pesó, y en promedio se obtuvo en todos los casos aproximadamente 3 gr. (FIGURA 6).

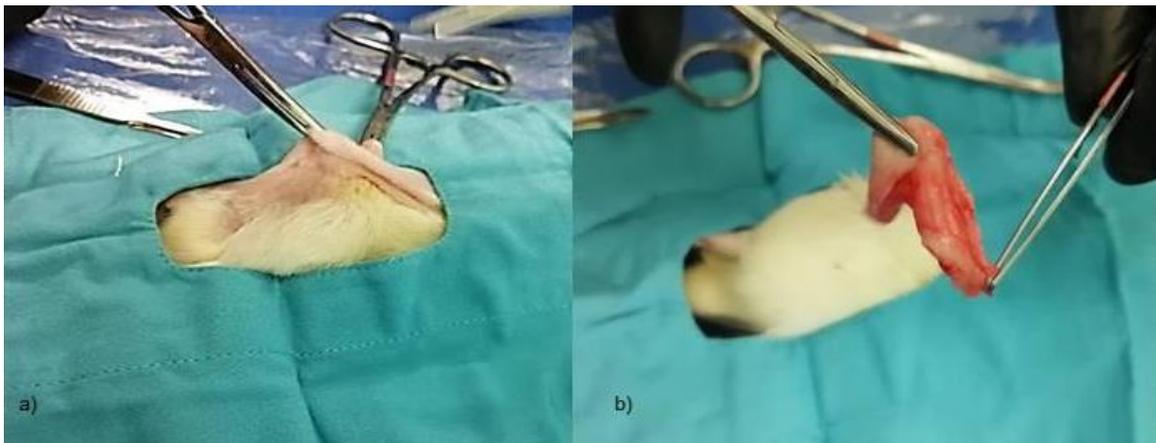


FIGURA 6: Extracción de Tejido Adiposo. a) Disección de tejido con pinzas mosco, b) Obtención de Tejido Adiposo.

El tejido adiposo obtenido se colocó en un tubo con solución HBSS 1x Biowest® adicionado con antibiótico/antimicótico al 2% Biowest® para su transporte e inmediato procesamiento.

La herida se suturó con seda 3-0 estéril utilizando la técnica de puntos simples y se limpió la herida con antiséptico (Antibenzil®) Para evitar algún tipo de infección postoperatoria los especímenes fueron medicados con antibiótico ENROXIL 5% (Enrofloxacin, 5 mg/ kg de peso) y para minimizar el dolor postoperatorio y de acuerdo al reglamento interno para el cuidado y uso de los animales de experimentación en Investigación y docencia en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, los especímenes fueron tratados con analgésico TRAMADOL JET® (Tramadol 5mg/kg de peso) después de la cirugía y cada 24 horas durante 3 días.

Obtención de Células Troncales Mesenquimales de Tejido Adiposo (MSCat).

En el cuarto de cultivos de GICTIT dentro del Laboratorio de Investigación en Odontología Almaraz, se realizó la extracción de las MSCat en condiciones estériles en una campana de seguridad biológica clase II, tipo 2.

Se realizaron 3 lavados del tejido en tubos con 4ml de solución (HBSS1x BIOWEST®, USA) adicionado con 1% de antibiótico/antimicótico (BIOWEST®, USA), para eliminar cualquier tipo de contaminante de la muestra. Cada lavado tuvo una duración de 5 minutos al finalizar las muestras se colocaron en cajas Petri de cristal, donde se realizó la disgregación de tejidos de forma mecánica con hojas de bisturí número 11, confrontando los filos hasta obtener fragmentos de 1 a 2 mm de diámetro aproximadamente, esto con la finalidad de facilitar la digestión enzimática, posteriormente se agregaron 3ml de Colagenasa tipo I al 0.01% (GIBCO®, USA) a 37° C. durante 45 minutos, con agitación manual cada 5 minutos.

Transcurrido ese tiempo la reacción enzimática se inactivó con 6 ml de D/MEM suplementado (BIOWEST®, USA), para inactivar la acción de la colagenasa, se filtró la muestra con un filtro de poro 100 µm dentro de un tubo de 15 ml para separar la matriz que no fue digerida, y la solución obtenida se centrifugó a 1040 µm a temperatura ambiente durante 10 min. Al terminar la primera centrifugación, se eliminó el sobrenadante lipídico con una pipeta, se tiró el resto del líquido por decantación para quedarse con el botón celular, se agregó 1 ml de medio de cultivo, las células se resuspendieron y se volvieron a centrifugar. Se aplicó el mismo procedimiento dos veces más hasta lograr que el botón celular quedara lo más limpio posible.

El botón celular obtenido fue resuspendido en D/MEM suplementado (BIOWEST®, USA) y se sembraron en un frasco de cultivo de 25 cm², Dicho frasco se mantuvo en la incubadora a 37° C con 5 % de CO² con humedad relativa. Después de 48 hrs. se observó la presencia de células adheridas.

Las células no adherentes se retiraron mediante lavados celulares con HBSS® BLOWEST 1% y se cambió de medio cada 48 y 72 hrs, hasta llegar al 80% de confluencia, posteriormente se realizaron los subcultivos (FIGURA 7).



FIGURA 7. Obtención de Células MSCat, a) Disgregación de tejido forma mecánica, b) Filtración de tejido, c) Centrifugación, d) Obtención de pellet células MSCat.

Subcultivos de MSCat.

Al llegar a la confluencia (80% de células en la superficie del frasco de cultivo), se realizaron 2 lavados con solución HBSS 1x, se retiró la solución y se agregó 1 ml de Tripsina (Trypsina/EDTA 0.1% BIOWEST, USA), durante 3 a 5 minutos en la incubadora a 37° C con 5% CO² se verificó en el microscopio invertido que las células se encontraban suspendidas en el medio, y se inactivó la acción enzimática con D/MEM suplementado con FBS 10%, agregando 2ml. Se centrifugó la suspensión a 1040 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, y se agregó 1ml de D/MEM al botón celular para su resuspensión, cuantificación y sembrado.

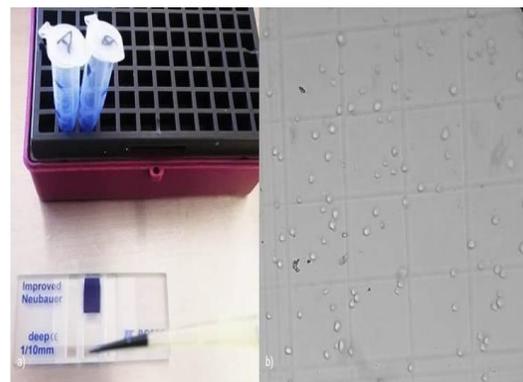
Cuantificación celular con cámara Neubauer.

Al obtener el botón celular resuspendido en medio de cultivo nuevo, se tomaron 50 µl de medio (bajo la fórmula de dilución), se colocaron en un tubo eppendorf de 1 ml, y se le adicionaron 50 µl de azul de Tripano, el cual sirve para contrastar las células viables. Se homogeneizó la mezcla, y se tomaron 10 µl de la solución, la cual se colocó en la cámara de Neubauer, y se realizó el conteo de los 4 cuadrantes en el microscopio óptico. Fórmula para la dilución de concentraciones:

C1*V1=C2*V2: Es la fórmula para diluciones donde C1 es la concentración de la solución que hará un soluto V1 el volumen inicial V2 el volumen a preparar y C2 la concentración de la solución final (FIGURA 8).

$$\frac{C1}{C2} \text{ ó } \frac{V2}{V1}$$

FIGURA 8. Cuantificación de células en cámara de Neubauer, a) Colocación de células MSCat suspendidas en azul de tripano para su conteo, b) Fotografía microscopio 5x Biowest.



Diferenciación celular al Linaje Osteogénico.

Para la diferenciación celular de los grupos de estudio a los que se les aplicó una terapia con células troncales mesenquimales de tejido adiposo (MSCat) diferenciadas al linaje osteogénico (MSCost), se realizaron subcultivos de las células troncales de tejido adiposo, hasta llegar al tercero, el cual es el subcultivo con mayor proliferación celular. Se realizaron dos lavados de HBSS, y se les agregó medio osteogénico, que contenía D/MEM suplementado con FBS al 10%, antibiótico/antimicótico al 2%, Dexametasona 0.1 mM, beta-glicerol-fosfato 10 mM y ascorbato-2-fosfato 10 mM. A partir de los 14 días de haber realizado el cambio de medio de cultivo celular, en el microscopio invertido se empezaron a observar cambios en la morfología celular, lo que evidenció la diferenciación celular al linaje osteogénico, evidencia previa con tinciones realizada por Yudho y cols (Yudho, 2007) (FIGURA 9).



FIGURA 9. a) Células MSCat en el tercer subcultivo, b) Células MSCost (diferenciación durante 15 días), tomando una morfología romboidal, Fotografía tomada con microscopio invertido ZEISS a 20X

Obtención del Andamio de PLA.

Los andamios de PLA al 10% (membranas preparadas con 10 gr de PLA, 75 ml de cloroformo y 25 ml de etanol mediante técnica de electrohilado), de forma laminar con un grosor de 0.7 a 1 mm, fueron donados por el Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez, director del laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Facultad de Odontología, UNAM.

Preparación de los constructos.

El PLA se procesó para poder realizar su implantación subdérmica en los grupos de estudios correspondientes. Fue cortado de forma circular con 8 mm de diámetro; los andamios obtenidos se esterilizaron bajo rayos UV durante 30 min.

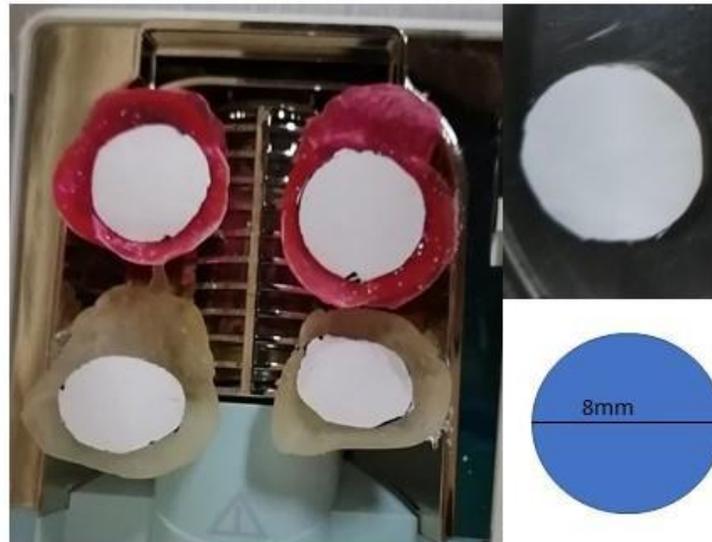


FIGURA 10. Esterilización de PLA en cámara de rayos ultravioleta.

Se colocaron en placas multipocillos de 24 y de acuerdo al grupo de estudio, se les agregó D/MEM suplementado para los grupos de estudio PLA + MSCat, y se incubaron a 37° C con 5 % CO² por 7 días para que el material absorbiera el medio necesario para que las células posteriormente, pudieran penetrar en los andamios (FIGURA 10). Para el grupo de estudio PLA sin células, se agregó al andamio D/MEM suplementado, y se incubaron a 37° C con 5% CO² por 7 días antes de su implantación; para el grupo de PLA + MSCat se agregaron 180, 500 células por constructo PLA + MSCat, se les agregó Medio Osteogénico, y se incubaron a 37° C con 5% CO² por 14 días antes de la cirugía de implantación subdérmica.

Sembrado celular en los andamios de PLA (Constructos).

Después de haber procesado los andamios de PLA y haberles adicionado D/MEM o medio osteogénico de acuerdo al grupo que correspondía en nuestro estudio, durante 7 días, se procedió al sembrado con MSCat y MSCost en dichos andamios, y así obtener los constructos necesarios para su implantación subdérmica.

Cuando se obtuvo el tercer subcultivo celular, se realizó un lavado con HBSS 1x, se agregó 1 ml de Tripsina al 1x durante 3 a 5 min. Para lograr la suspensión de las células, se inactivó la acción enzimática con D/MEM suplementado, se centrifugó dicha suspensión y se obtuvo el botón celular, el cual fue sometido a conteo a través de la Cámara de Neubauer. Al terminar el conteo celular, a cada andamio de PLA se implantaron 180, 500 células y se incubaron a 37°C con 5% CO² por 7 días antes de su implantación subdérmica (FIGURA 11).



FIGURA 11. Preparación de PLA, previo a la cirugía, donde se observan las 3 capas<

Diseño quirúrgico de implantación subdérmica.

Antes del procedimiento quirúrgico se unieron las 3 capas de PLA sembrado y se cortaron en 3 partes, cada tricapa se unió con sutura seda 3/0 en la parte extrema y se colocaron en un multipocillos para su posterior implantación (FIGURA 12.)

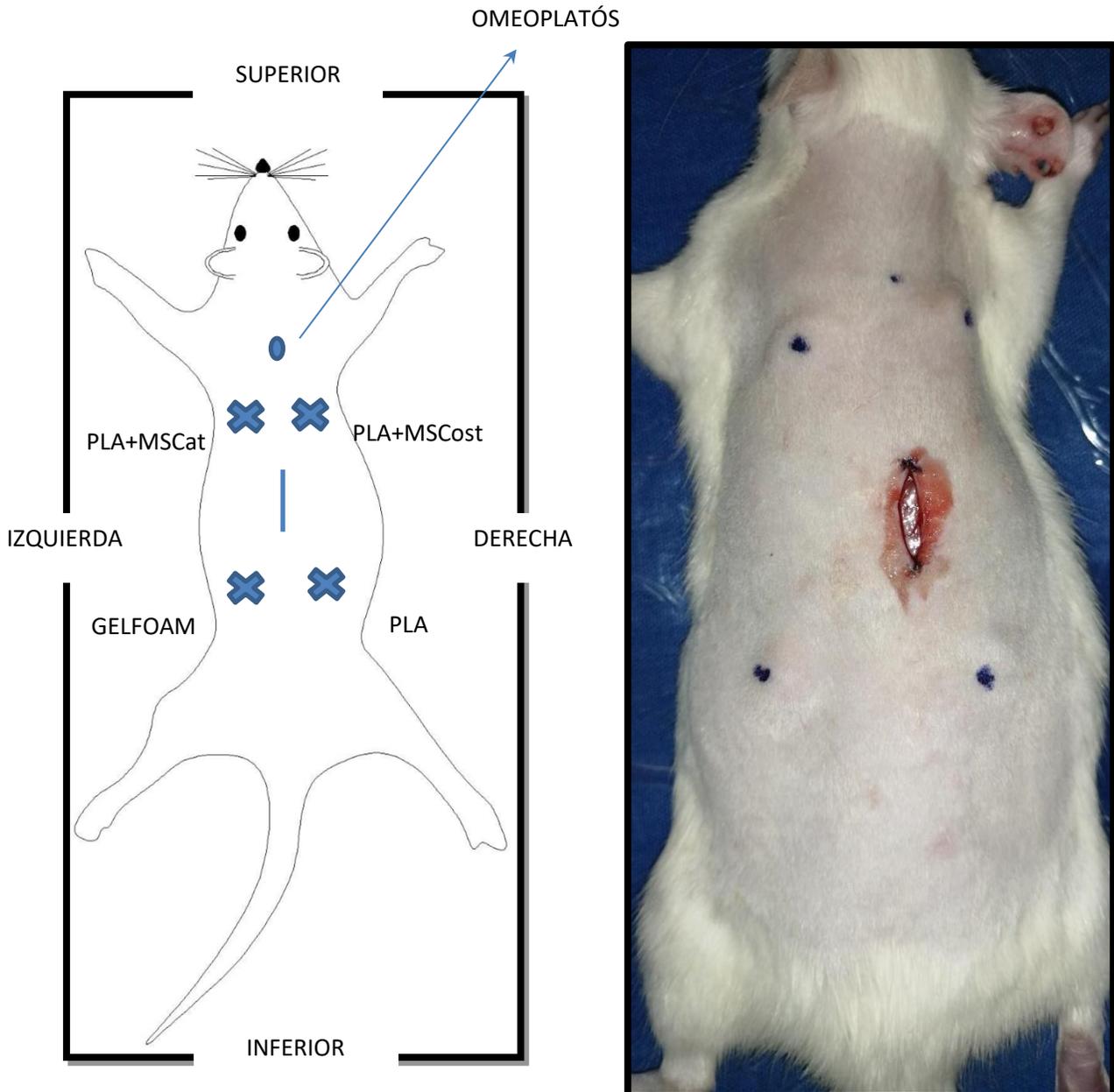


FIGURA 12. Diseño quirúrgico de implantación subdérmica.

Implantación subdérmica.

Los especímenes fueron pesados con una báscula digital, anestesiados vía intraperitoneal con Sedalphorte y relajante muscular PROCIN. Se rasuró la región dorsal, se desinfectó la zona con solución ANTIBENZIL y se cubrió la zona con un campo estéril hendido. El acceso quirúrgico fue en la epidermis tomando como referencia anatómica un punto medio a caudal 2.5 cm entre los omóplatos para realizar la incisión.

Siguiendo los principios de la cirugía, se realizó la incisión de la dermis aproximadamente 2 o 3 centímetros de longitud; de una sola intención (FIGURA 13).

Se utilizaron pinzas mosco para realizar la disección roma y, posteriormente, se implantaron los constructos PLA (derecho inferior), PLA + MSCat (izquierdo superior), PLA + MSCost (derecho superior), Gelfoam (izquierdo inferior). Finalmente, se suturó con la técnica de puntos simples y los especímenes fueron medicados con antibiótico ENROXIL 5% y TRAMADOL (5 mg/kg de peso) (FIGURA 14).

Se monitorearon los especímenes hasta terminar el tiempo de estudio (21 y 60 días), posteriormente, se sacrificaron por sobre exposición de CO² en una cámara de gas, dentro de la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la Fes Cuautitlán C-4.



FIGURA 13. Incisión en la zona dorsal del espécimen.

PLA + MSCost IMPLANTE SUBDERMICO EN LA PARTE SUPERIOR DERECHA



PLA + MSCat IMPLANTE SUBDERMICO EN LA PARTE SUPERIOR IZQUIERDA



PLA IMPLANTE SUBDERMICO EN LA PARTE INFERIOR DERECHA



GELFOAM IMPLANTE SUBDERMICO EN LA PARTE INFERIOR IZQUIERDA



FIGURA 14. Implantación subdérmica de cada grupo de estudio.

Procesamiento de la muestra control de inflamación.

Durante el estudio de 21 y 60 días se realizó un registro fotográfico macroscópico con una cámara digital Huawei P30 lite con zoom al 4.0 X, sin filtros y se tomaron 3 fotografías a cada espécimen, registrando a partir de un periodo de tiempo de 1, 3, 5, 7 días en el estudio de 21 días y 7, 10,15, 20 días en el estudio de 60 días (Ver Anexos 3 y 4 Tabla de registro inflamatorio. Se estudió el grado inflamatorio con la siguiente escala: Nulo (0), Leve (+), Moderado (++), Severo (+++). (FIGURA 15.)

Para evaluar el grado de inflamación revisamos los signos cardinales: Calor, edema, rubor, tumefacción y pérdida de la función de la siguiente manera:

- Inflamación severa: presencia de calor o elevación de la temperatura corporal. Rubor: el grado mayor de enrojecimiento en el área de la herida con los bordes de la misma en una gama del rojo al magenta.
- Inflamación moderada: presencia de calor, pero solo en el área de la herida. Rubor: presencia de enrojecimiento leve en el área de la herida y presencia de tumefacción que aumentará el volumen del tejido y que a la digito presión el tejido se presentaba sésil.
- Inflamación leve: presencia de tumefacción ligera que aumentará levemente el volumen sin ser sésil.
- Inflamación Nula: No presentó inflamación: en todos aquellos especímenes en los cuales la herida se encontrará intacta, sin aumento de volumen ni enrojecimiento y que mantenía sus funciones normales.

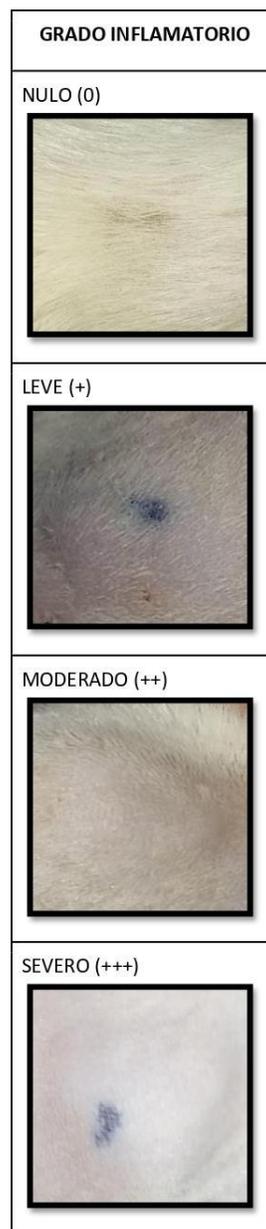


FIGURA 15. Control inflamatorio.

Procesamiento de la muestra para Histología.

Al obtener las muestras de piel de los especímenes, se fijaron con paraformaldehído al 4% y un buffer de PBS. Los procedimientos realizados para el procesamiento de muestras fueron realizados de acuerdo al manual de Procedimientos Básicos del Laboratorio de Apoyo y Diagnóstico, realizado por el Dr. Germán Isauro Garrido Fariña.

Posteriormente, las muestras se deshidrataron siguiendo el protocolo de inclusión de rutina (TABLA 2).

REACTIVO	TIEMPO DE IRRADIACIÓN (MICROONDAS)	TIEMPO DE REPOSO	TIEMPO TOTAL X CONCENTRACIÓN DE ALCOHOL
Alcohol 70%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 70%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 80 %	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 80 %	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 92%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 92%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 98%	2 minutos	13 minutos	15 minutos

Alcohol 98%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 100%	2 minutos	13 minutos	15 minutos
Alcohol 100%	2 minutos	13 minutos	15 minutos

TABLA 2. Proceso de deshidratación de muestras para su inclusión.

Como reactivo de enlace se utilizó Xileno- cloroformo (1:1) realizando dos cambios en 24 horas, a temperatura ambiente. Las muestras deshidratadas se incluyeron en parafina I, durante 2 horas, y posteriormente, se incluyeron finalmente en parafina II durante 2 horas, a una temperatura de 48°C.

Se realizaron cortes seriados de la muestra incluida de 4 (micras) de espesor y puestos para su expansión de un baño de agua, los cuales fueron montados con portaobjetos cubiertos de Albúmina.

Tinción de Hematoxilina y Eosina H&E.

Se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) para observar las características morfológicas mediante un microscopio óptico Zeiss (Axiolab.A1 marca Carl Zeiss). (TABLA 3).

REACTIVO	TIEMPO
Xilol	15 minutos
Xilol	15 minutos
Alcohol absoluto	5 minutos
Alcohol absoluto	5 minutos
Alcohol 96%	5 minutos
Alcohol 96%	5 minutos
Alcohol 80%	5 minutos
Alcohol 70%	5 minutos
Agua destilada	Rápido
Hematoxilina	15 minutos
Agua destilada	Rápido

Alcohol ácido	Rápido
Agua corriente	Rápido
Carbonato de Litio 1%	1 minuto
Agua destilada	Rápido
Eosina Acuosa	15 minutos
Lavado con agua corriente	Rápido
Alcohol 96%	5 minutos
Alcohol Absoluto	5 minutos
Alcohol Absoluto	5 minutos
Xilol	5 minutos
Xilol (montaje)	5 minutos

TABLA 3. Proceso de tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E) de las muestras de piel

Se utilizó resina sintética para hacer permanente la muestra y poder observar en el microscopio.

Tinción de Tricrómico de Masson.

Principio: La coloración nuclear por hematoxilina directa progresiva y las coloraciones de las estructuras, con coloración de acidófila decreciente.

Fijación: Pueden emplearse todos los fijadores habituales, y evitando los que contengan tetróxido de osmio.

Procedimiento
Desparafinar e hidratar
Solución Bouin, 1 hora a 56 ^o C, si se fijó en formol
Lavar con agua corriente, hasta quitar el colorante
Lavar en agua destilada
Teñir con hematoxilina de Weigert, 10 minutos
Lavar en agua destilada
Sumergir en sol. Escarlata de Biebrich, 5 min.
Lavar agua destilada
Sumergir en sol. ácido fosfotúngstico o fosfomolibdico, de 10 a 15 min
Teñir con sol. azul de anilina al 1 %, de 10 a 15 min.
Teñir con verde luz al 1 %, 5 min.
Lavar en agua destilada
Sumergir en sol. de ácido acético al 1 %, de 3 a 5 min.
Deshidratar. Aclarar. Cubrir.

TABLA 4. Proceso de tinción con Tricrómico de Masson de las muestras de piel.

Resultados:

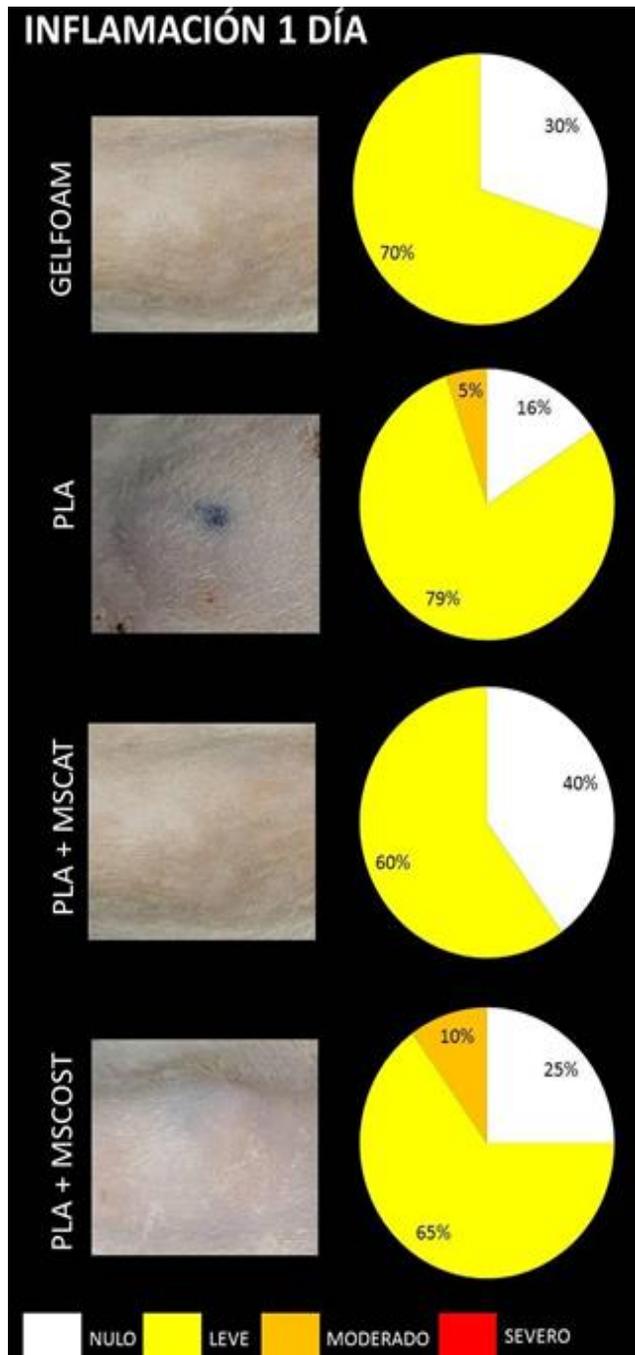
Núcleos: negros.

Citoplasma, queratina, músculo estriado: rojo.

Colágena y moco: azul a verde.

RESULTADOS

1. Control inflamación 21 y 60 días.



INFLAMACIÓN 1 DÍA:(FIGURA 16)

El grupo Gelfoam tuvo un porcentaje del 70% de inflamación leve y el 30% de inflamación nula.

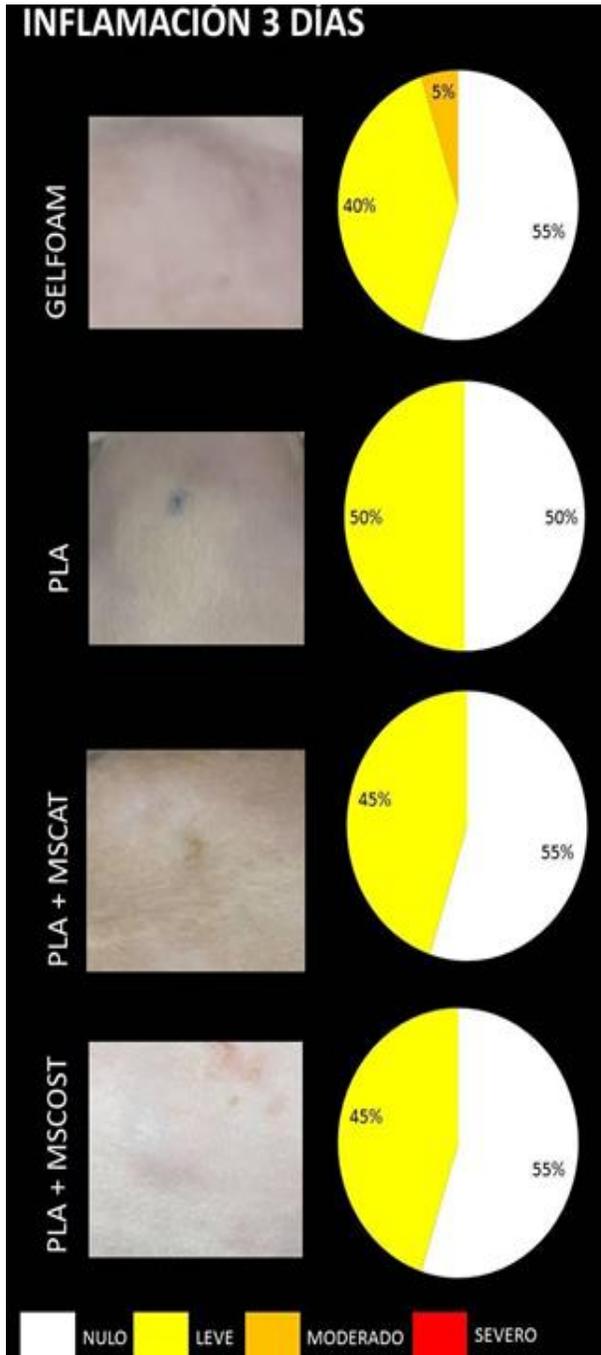
El grupo PLA tuvo un porcentaje del 79% de inflamación leve y el 16% de inflamación nula y con el 5% de inflamación moderada.

El grupo PLA + MSCAT tuvo un porcentaje del 60% de inflamación leve y el 40% de inflamación nula.

El grupo PLA + MSCOST tuvo un porcentaje del 65% de inflamación leve, 25% de inflamación nula y con el 10% de inflamación moderada.

En general, en los cuatro grupos, se observó un porcentaje mayor en el grado inflamatorio leve, en segundo lugar, el grado inflamatorio nulo y, en tercer lugar, el grado inflamatorio moderado del en ninguno de los 4 grupos de estudio (GELFOAM, PLA, PLA +MSCAT, PLA + MSCOST) obtuvo un grado inflamatorio severo. Lo que nos indicó que los especímenes no tuvieron una reacción inflamatoria severa ante el constructo como cuerpo extraño, esto de acuerdo a la evaluación clínica.

FIGURA 16. Grado Inflamatorio 1 día



INFLAMACIÓN 3 DÍAS: (FIGURA 17)

El grupo Gelfoam tuvo un porcentaje del 40% de inflamación leve, el 5% de inflamación moderada y el 55% inflamación nula.

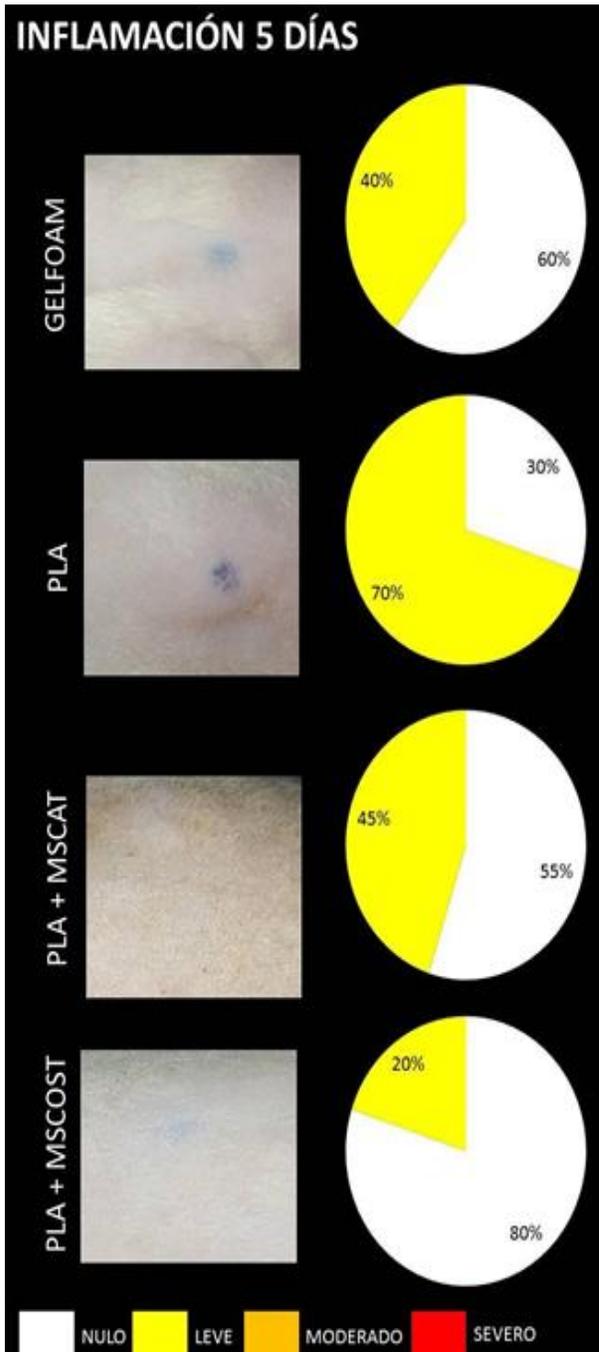
El grupo PLA tuvo un porcentaje del 50% de inflamación leve y el 50% de inflamación nula.

El grupo PLA + MSCAT tuvo un porcentaje del 45% de inflamación leve y el 55% de inflamación nula.

El grupo PLA + MSCOST tuvo un porcentaje del 43% de inflamación leve, 55% de inflamación nula

En general, en los cuatro grupos, se observó un porcentaje mayor en el grado inflamatorio nulo del 53.75%, en segundo lugar, el grado inflamatorio leve del 45%, en tercer lugar, el grado inflamatorio moderado del 1.25% y ninguno de los 4 grupos de estudio (GELFOAM, PLA, PLA +MSCAT, PLA + MSCOST) se obtuvo un grado inflamatorio severo. Lo que indica que los especímenes no tuvieron una reacción severa ante un cuerpo extraño de acuerdo a la evaluación clínica.

FIGURA 17. Grado Inflamatorio 3 días.



INFLAMACIÓN 5 DÍAS: (FIGURA 18)

El grupo Gelfoam tuvo un porcentaje del 40% de inflamación leve, el 60% de inflamación nula.

El grupo PLA tuvo un porcentaje del 70% de inflamación leve y el 30% de inflamación nula.

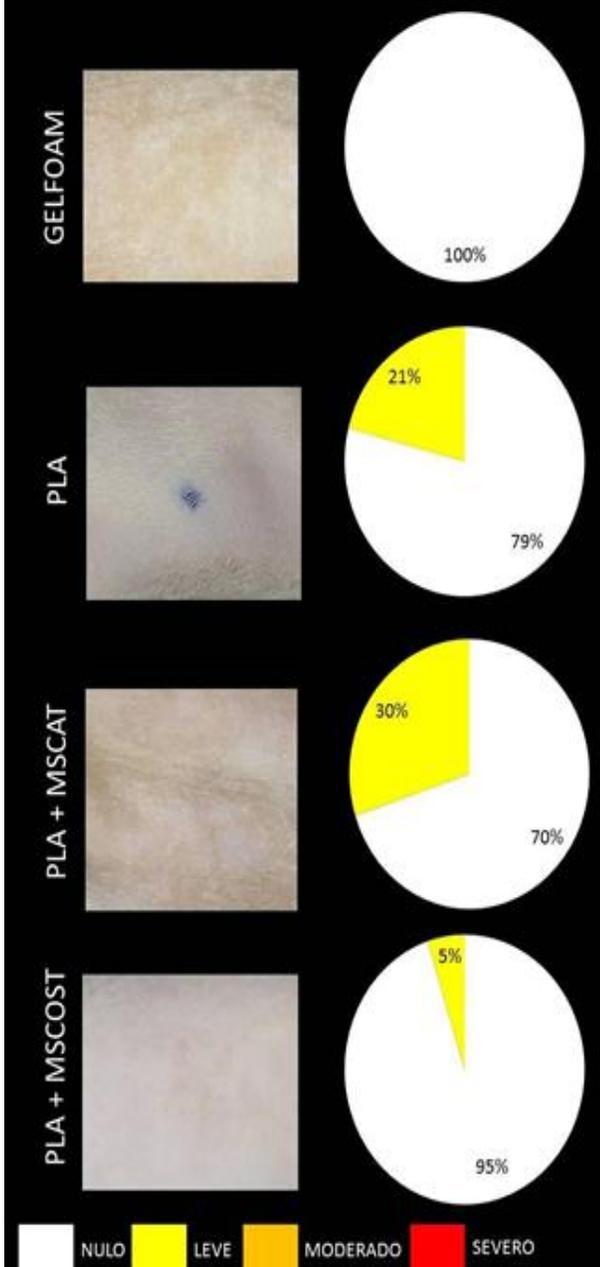
El grupo PLA + MSCAT tuvo un porcentaje del 45% de inflamación leve y el 55% de inflamación nula.

El grupo PLA + MSCOST tuvo un porcentaje del 20% de inflamación leve, 80% de inflamación nula.

Se observó un porcentaje mayor en el grado inflamatorio nulo del 56.25%, en segundo lugar, el grado inflamatorio leve del 43.75%, ninguno de los 4 grupos de estudio (GELFOAM, PLA, PLA +MSCAT, PLA + MSCOST) se obtuvo un grado inflamatorio moderado o severo. Lo que indica que los especímenes no tuvieron una reacción severa ante un cuerpo extraño de acuerdo a la evaluación clínica.

FIGURA 18. Grado Inflamatorio 5 días.

INFLAMACIÓN 7 DÍAS



INFLAMACIÓN 7 DÍAS: (FIGURA 19)

El grupo Gelfoam tuvo un porcentaje 100% de inflamación nula.

El grupo PLA tuvo un porcentaje del 21% de inflamación leve y el 79% de inflamación nula.

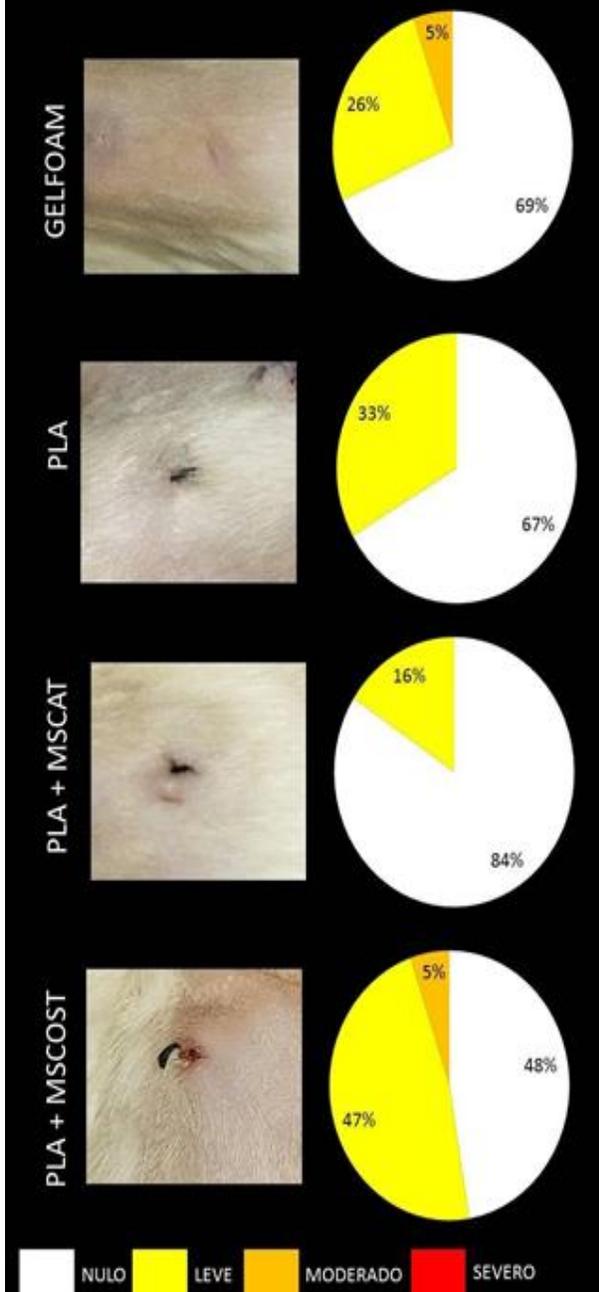
El grupo PLA + MSCAT tuvo un porcentaje del 30% de inflamación leve y el 70% de inflamación nula.

El grupo PLA + MSCOST tuvo un porcentaje del 5% de inflamación leve, 95% de inflamación nula.

Se observó un porcentaje mayor en el grado inflamatorio nulo del más del 70%, de los grupos de estudio en segundo lugar el grado inflamatorio leve del 14%, ninguno de los 4 grupos de estudio (GELFOAM, PLA, PLA +MSCAT, PLA + MSCOST) se obtuvo un grado inflamatorio moderado o severo. Lo que indica que los especímenes no tuvieron una reacción severa ante un cuerpo extraño de acuerdo a la evaluación clínica. Se colocaron las fotografías más representativas de cada grupo de estudio.

FIGURA 19. Grado Inflamatorio 7 días.

INFLAMACIÓN 10 DÍAS



INFLAMACIÓN 10 DÍAS:(FIGURA 20)

El grupo Gelfoam tuvo un porcentaje 5% de inflamación moderada, 26% de inflamación leve y 69% de inflamación nula.

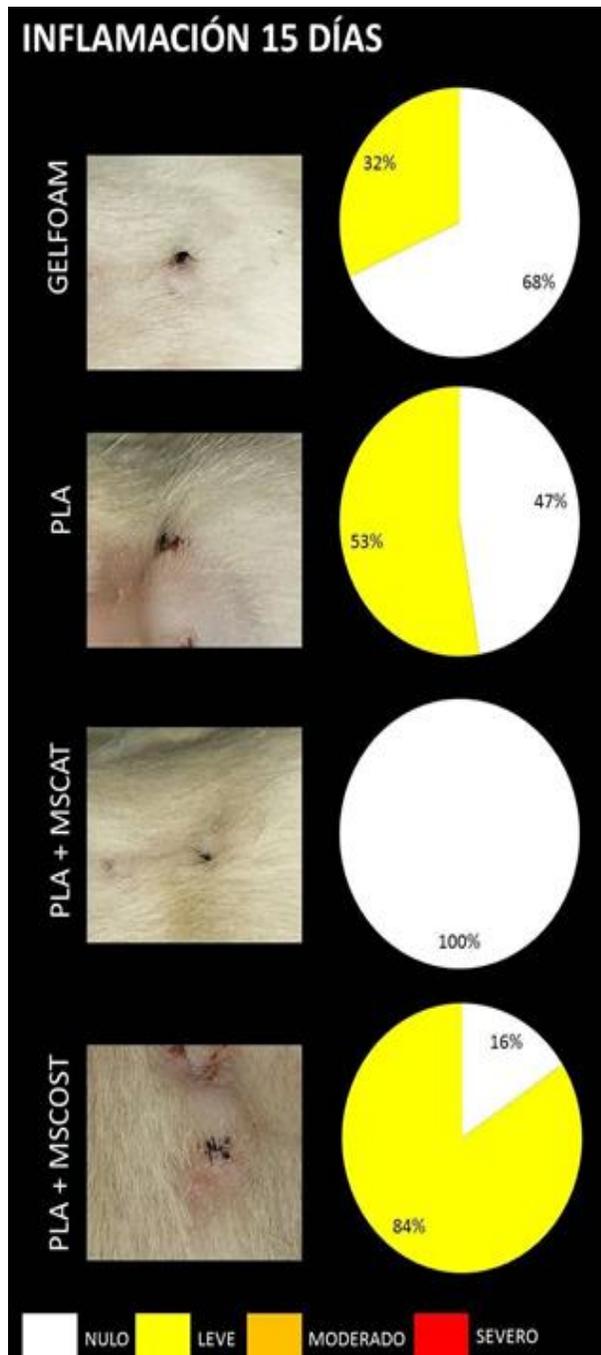
El grupo PLA tuvo un porcentaje del 33% de inflamación leve y el 67% de inflamación nula.

El grupo PLA + MSCAT tuvo un porcentaje del 16% de inflamación leve y el 84% de inflamación nula.

El grupo PLA + MSCOST tuvo un porcentaje del 5% de inflamación moderada, 47% de inflamación leve y 48% de inflamación nula.

Se observó un porcentaje mayor en el grado inflamatorio nulo del más del 67%, en segundo lugar, el grado inflamatorio leve del 30%, en tercer lugar, el grado inflamatorio moderado del 2.5%, ninguno de los 4 grupos de estudio (GELFOAM, PLA, PLA +MSCAT, PLA + MSCOST) se obtuvo un grado inflamatorio severo. Lo que indica que no hubo una reacción severa ante un cuerpo extraño de acuerdo a la evaluación clínica, también podemos observar el crecimiento de pelo en la zona del implante quirúrgico.

FIGURA 20. Grado Inflamatorio 10 días.



INFLAMACIÓN 15 DÍAS: (FIGURA 21)

El grupo Gelfoam tuvo un porcentaje 32% de inflamación leve y 68% de inflamación nula.

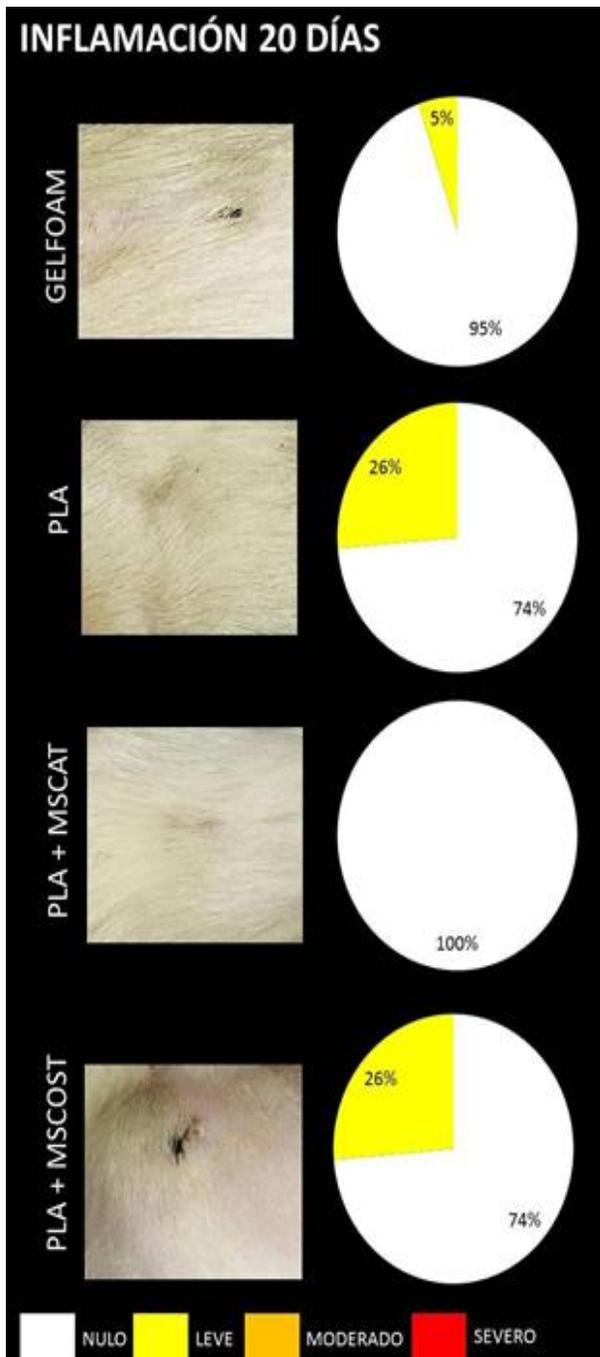
El grupo PLA tuvo un porcentaje del 53% de inflamación leve y el 47% de inflamación nula.

El grupo PLA + MSCAT tuvo un porcentaje del 100% de inflamación nula.

El grupo PLA + MSCOST tuvo un porcentaje del 16% de inflamación leve y 84% de inflamación nula

Se observó un porcentaje mayor en el grado inflamatorio nulo del más del 57.75% de los grupos de estudio en segundo lugar el grado inflamatorio leve del 42.25%, ninguno de los 4 grupos de estudio (GELFOAM, PLA, PLA +MSCAT, PLA + MSCOST) se obtuvo un grado inflamatorio moderado o severo. Lo que indica que los especímenes no tuvieron una reacción severa ante un cuerpo extraño de acuerdo a la evaluación clínica también podemos observar el crecimiento de pelo en la zona del implante quirúrgico.

FIGURA 21. Grado Inflamatorio 15 días.



INFLAMACIÓN 20 DÍAS:(FIGURA 22)

El grupo Gelfoam tuvo un porcentaje 5% de inflamación leve y 95% de inflamación nula.

El grupo PLA tuvo un porcentaje del 26% de inflamación leve y el 74% de inflamación nula.

El grupo PLA + MSCAT tuvo un porcentaje del 100% de inflamación nula.

El grupo PLA + MSCOST tuvo un porcentaje del 26% de inflamación leve y 74% de inflamación nula

Se observó un porcentaje mayor en el grado inflamatorio nulo del más del 85.75% de los grupos de estudio en segundo lugar el grado inflamatorio leve del 53.25%, ninguno de los 4 grupos de estudio (GELFOAM, PLA, PLA +MSCAT, PLA + MSCOST) se obtuvo un grado inflamatorio moderado o severo. Lo que indica que los especímenes no tuvieron una reacción severa ante un cuerpo extraño de acuerdo a la evaluación clínica también podemos observar crecimiento de pelo en la zona del implante quirúrgico.

FIGURA 22. Grado Inflamatorio 20 días.

2. Sacrificios 21 y 60 días.

Una vez transcurrido los tiempos de estudio se sacrificó a los especímenes por sobre exposición de CO2 en una cámara de gas, dentro de la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la FES Cuautitlán C-4. Se obtuvieron las muestras de los grupos de estudio para su procesamiento histológico. (FIGURA 23 y 24)



FIGURA 23. Sacrificios a los 21 días, grupos de estudio: Gelfoam, Pla, PLA+MSCat, PLA+MSCost.

SACRIFICIOS 60 DÍAS	
	<p>GELFOAM</p> <p>No se observa el biomaterial ya que se reabsorbió .</p>
	<p>PLA</p> <p>Se observa la integración del biomaterial al tejido conectivo, ligera vascularización y adherido a la piel.</p>
	<p>PLA + MSCAT</p> <p>Se observa vascularización y ligera integración de los bordes del biomaterial.</p>
	<p>PLA + MSCOST</p> <p>Se observa vascularización y ligera integración de los bordes del biomaterial.</p>

FIGURA 24. Sacrificios a los 60 días, grupos de estudio: Gelfoam, Pla, PLA+MSCat, PLA+MSCost.

3. Resultados Histológicos H & E.

Una vez procesadas las muestras histológicas con la tinción de H&E, se obtuvieron los cortes histológicos que se analizaron a los 21 y 60 días de acuerdo al tiempo de estudio (FIGURA 25).

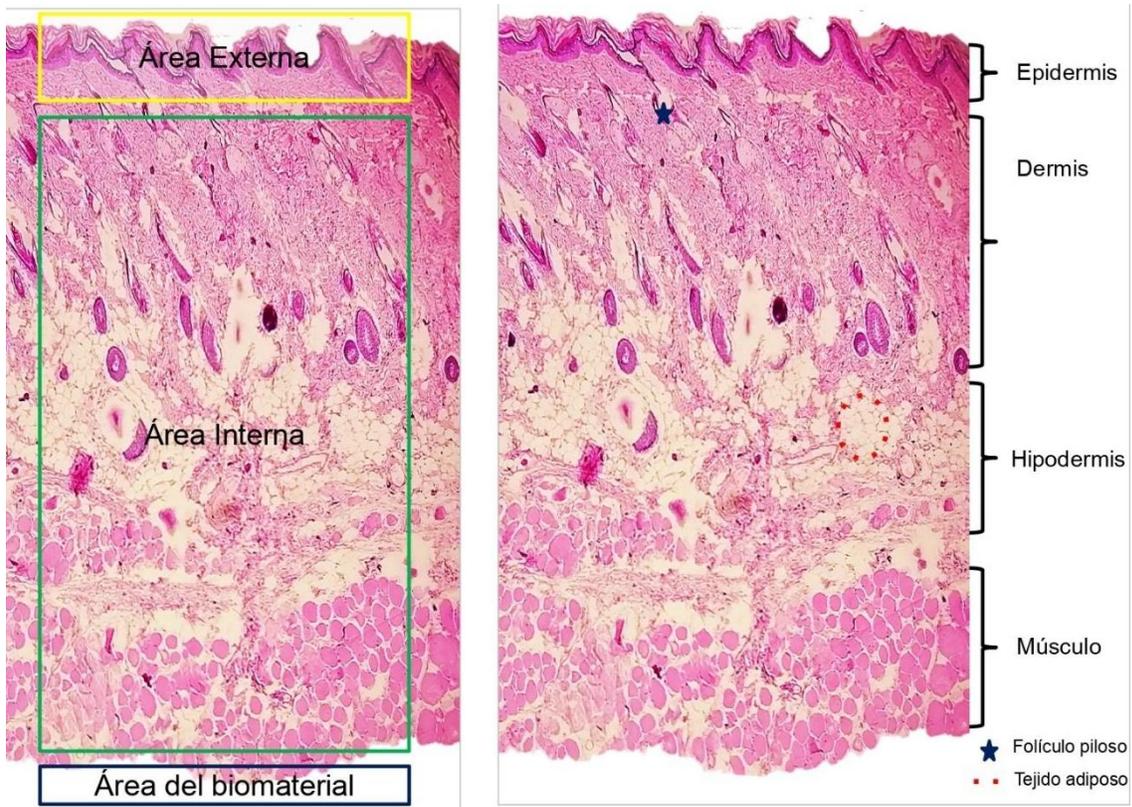


FIGURA 25. Muestra de piel teñida con H & E, tomada al 10X con microscopio invertido (ZEISS), Descripción de las capas de la piel y las áreas a evaluar.

GELFOAM 21D

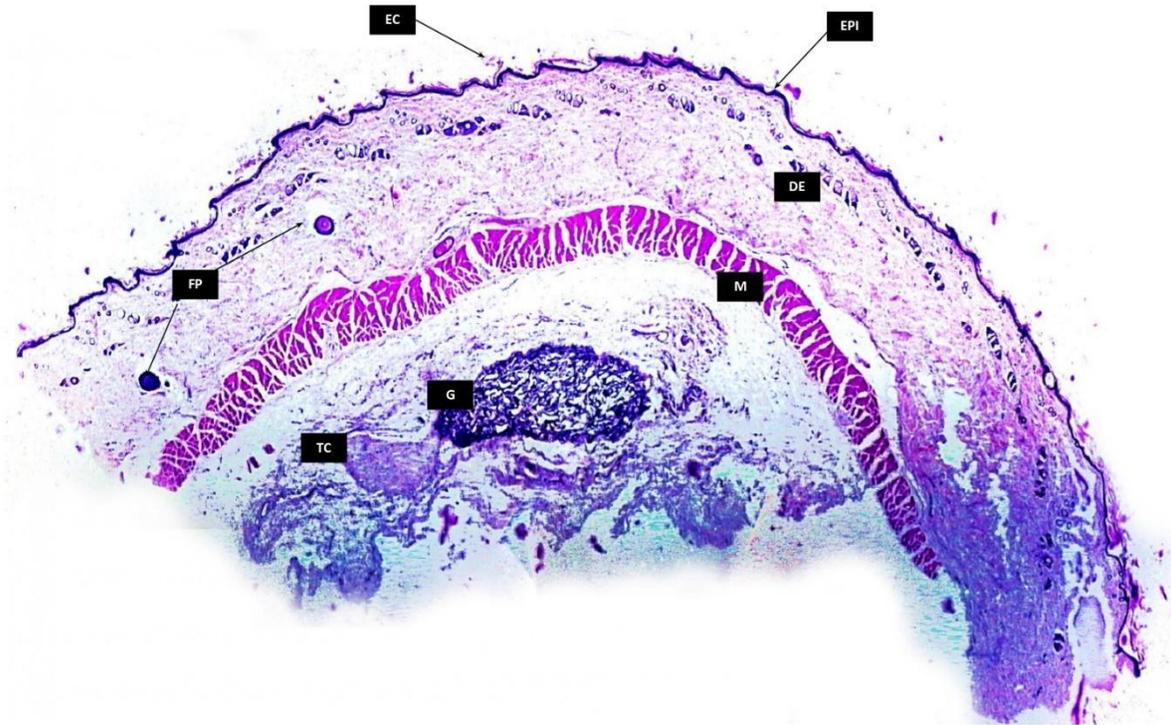


FIGURA 26. Muestra de piel teñida con H & E, tomada al 10X, estructuras del corte Histológico

EP (Epidermis), DE (Dermis), EC (Estrato Córneo), VS (Vaso Sanguíneo), M (Músculo), TC (Tejido Conectivo), G (Gelfoam).

En el área externa se observa la epidermis intacta y en la periferia el estrato córneo intacto. En el área interna se observa la dermis donde se observan los folículos pilosos y la hipodermis, donde se observa tejido muscular. Debajo del tejido conectivo se observa el área del biomaterial (Gelfoam), sin reacción inflamatoria o granulomatosa (FIGURA 26).

GELFOAM 60D

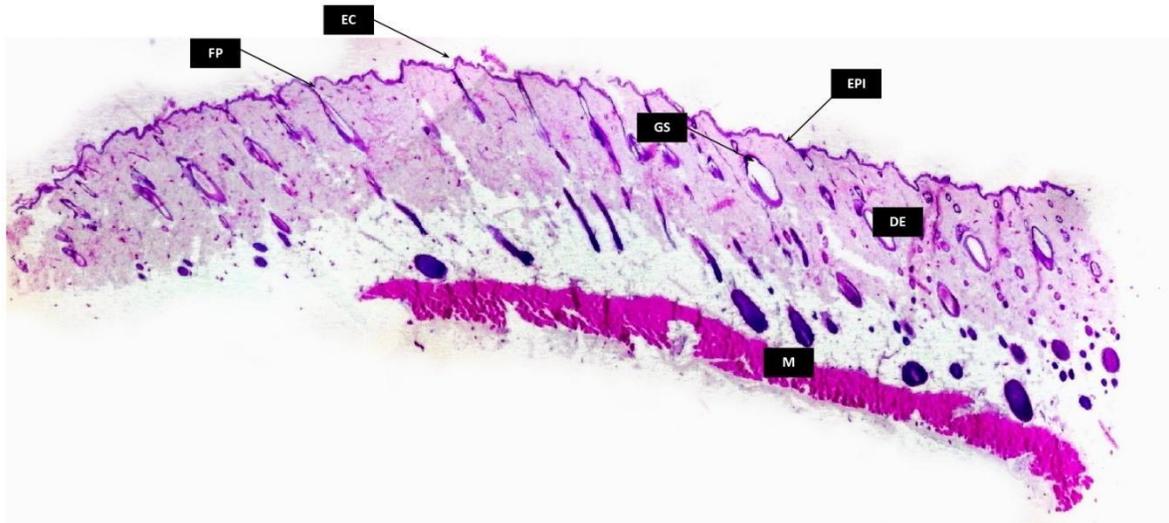


FIGURA 27. Muestra de piel teñida con H & E, tomada al 10X, estructuras del corte Histológico

EP (Epidermis), EC (Estrato Córneo), FP (Folículo Piloso), DE (Dermis), GS (Glándula Sebácea), M (Músculo).

En el área externa se observa la epidermis intacta en la periferia se observa el estrato córneo intacto. En el área interna se observa la dermis, los folículos pilosos y en la hipodermis se observa tejido muscular. El Gelfoam se reabsorbe por completo sin crear algún proceso de rechazo (FIGURA 27).

PLA 21D

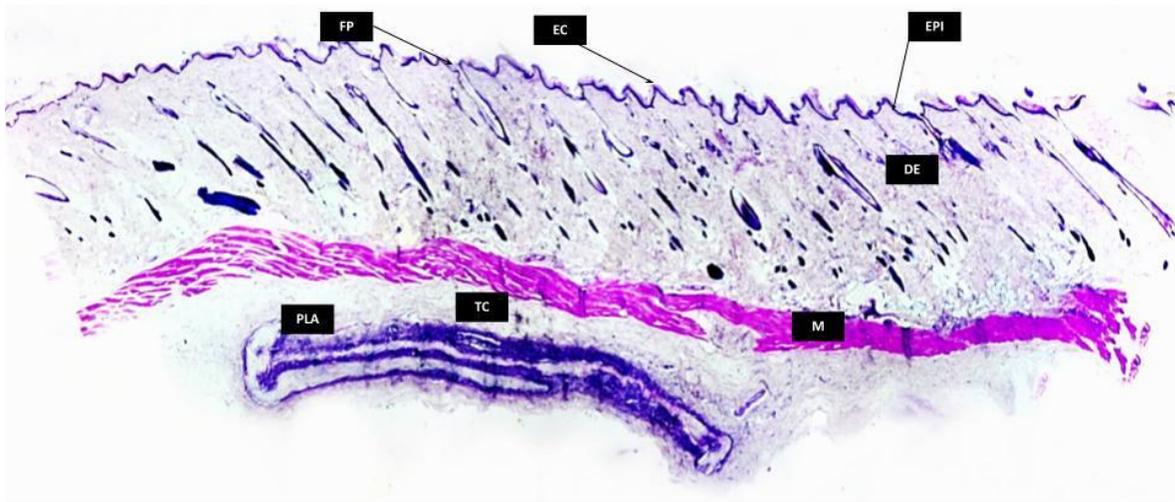


FIGURA 28. Muestra de piel teñida con H & E, tomada al 10X, estructuras del corte Histológico

EP (Epidermis), DE (Dermis), EC (Estrato Córneo), M (Músculo), TC (Tejido Conectivo), PLA (Ácido Poliláctico).

En el área externa se observa la epidermis intacta y en la periferia el estrato córneo intacto. En el área interna se observa la dermis donde se observan folículos pilosos los cuales se encuentran intactos y la hipodermis, donde se observa el tejido muscular. Debajo del tejido conectivo se observa el área del biomaterial (PLA), sin reacción inflamatoria o granulomatosa, se observan las células en la periferia, no hay degradación y se observan las tres capas. (FIGURA 28).

PLA 60D

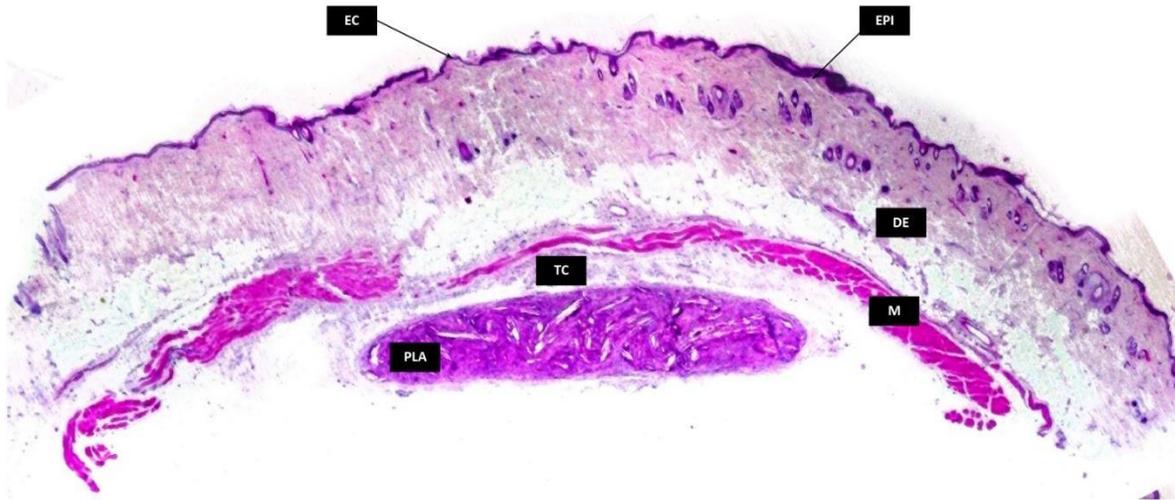


FIGURA 29. Muestra de piel teñida con H & E, tomada al 10X, estructuras del corte Histológico

EP (Epidermis), DE (Dermis), EC (Estrato Córneo), M (Músculo), TC (Tejido Conectivo), PLA (Ácido Poliláctico).

En el área externa se observa la epidermis intacta en la periferia se observa el estrato córneo intacto. En el área interna se observa la dermis y en la hipodermis se observa el tejido muscular. Debajo del tejido conectivo se observa el área del biomaterial (PLA), sin reacción inflamatoria o granulomatosa, no hay degradación y no se observan las capas del biomaterial (FIGURA 29).

PLA + MSCAT 21D

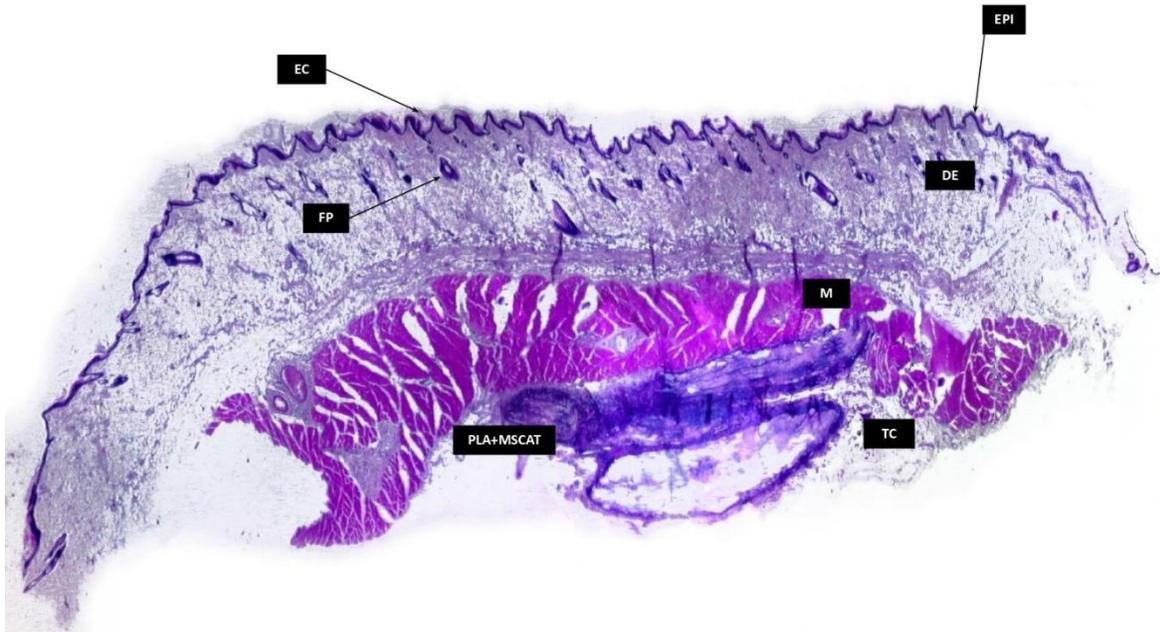


FIGURA 30. Muestra de piel teñida con H & E, tomada al 10X, estructuras del corte Histológico

EP (Epidermis), DE (Dermis), EC (Estrato Córneo), FP (Folículo Piloso), M (Músculo), TC (Tejido Conectivo), PLA + MSCAT (Ácido Poliláctico + MSCat).

En el área externa se observa la epidermis intacta y en la periferia el estrato córneo intacto. En el área interna se observa la dermis donde se observan los folículos pilosos y la hipodermis, donde se observa el tejido muscular. Debajo del tejido conectivo se observa el área del biomaterial (PLA + MSCat), sin reacción inflamatoria o granulomatosa, no hay degradación (FIGURA 30).

PLA + MSCAT 60D

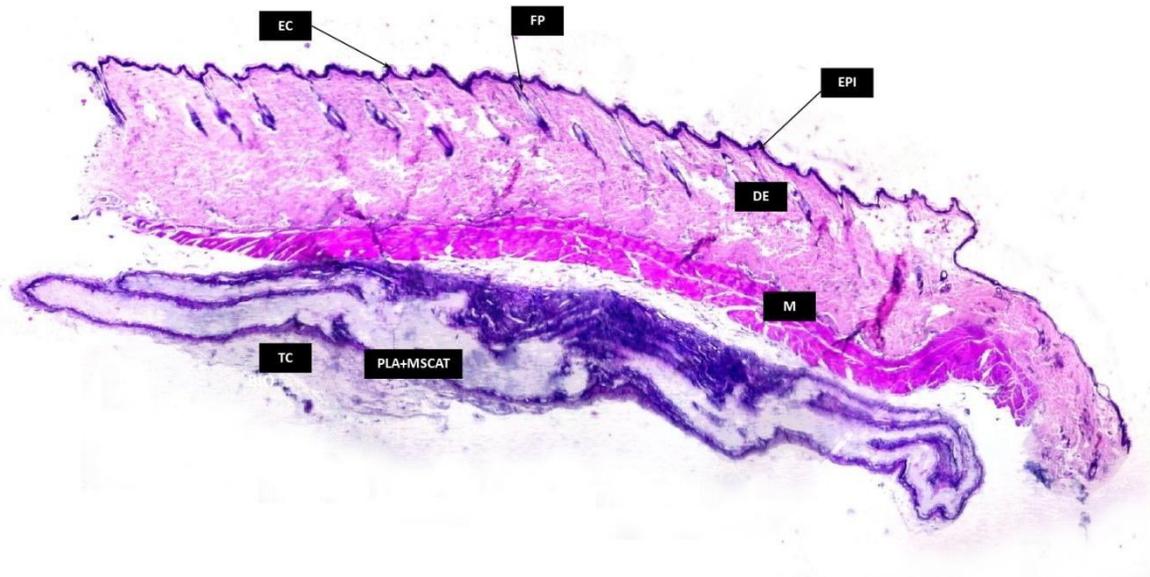


FIGURA 31. Muestra de piel teñida con H & E, tomada al 10X, estructuras del corte Histológico

EP (Epidermis), EC (Estrato Córneo), FP (Folículo Piloso), DE (Dermis), M (Músculo), TC (Tejido Conectivo).

En el área externa se observa la epidermis intacta y en la periferia el estrato córneo intacto. En el área interna se observa la dermis y en la hipodermis se observa el tejido muscular. Debajo del tejido conectivo se observa el área del biomaterial (PLA+MSCat), sin reacción inflamatoria o granulomatosa, no hay degradación y no se observan las capas del biomaterial (FIGURA 31).

PLA + MSCOST 21D

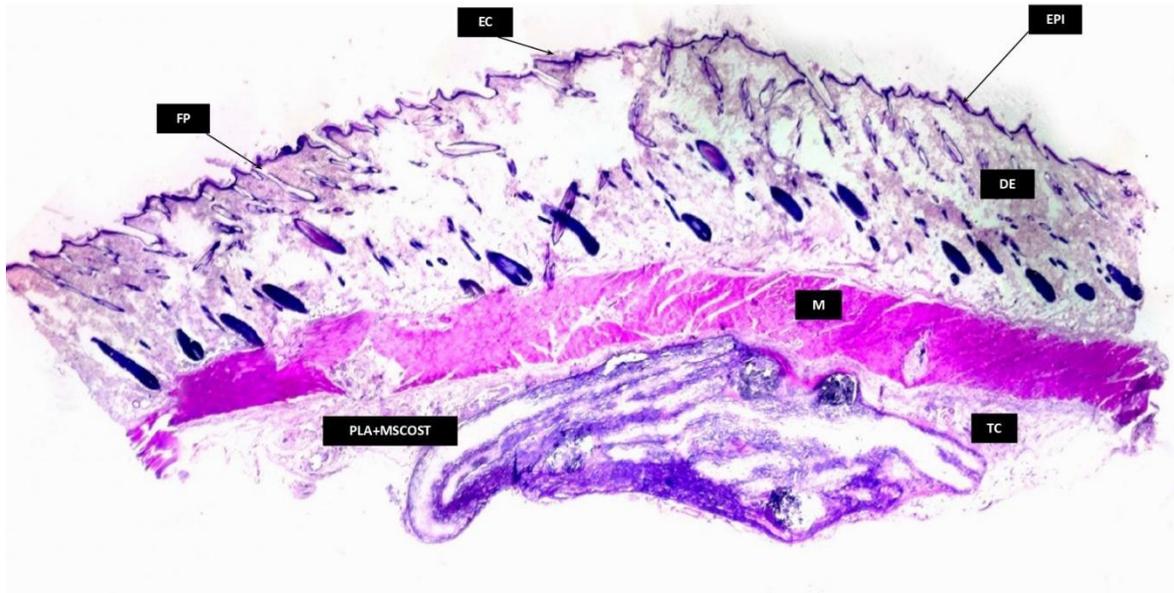


FIGURA 32. Muestra de piel teñida con H & E, tomada al 10X, estructuras del corte Histológico

EP (Epidermis), EC (Estrato Córneo), FP (Folículo Piloso), DE (Dermis), M (Músculo), TC (Tejido Conectivo), PLA + MSCost (Ácido Poliláctico + MSCost).

En el área externa se observa la epidermis intacta y en la periferia el estrato córneo intacto. En el área interna se observa la dermis, los folículos pilosos intactos y en la hipodermis se observa el tejido muscular. Debajo del tejido conectivo se observa el área del biomaterial (PLA + MSCost), sin reacción inflamatoria o granulomatosa, no hay degradación y se observan las capas del biomaterial. (FIGURA 32).

PLA + MSCOST 60D

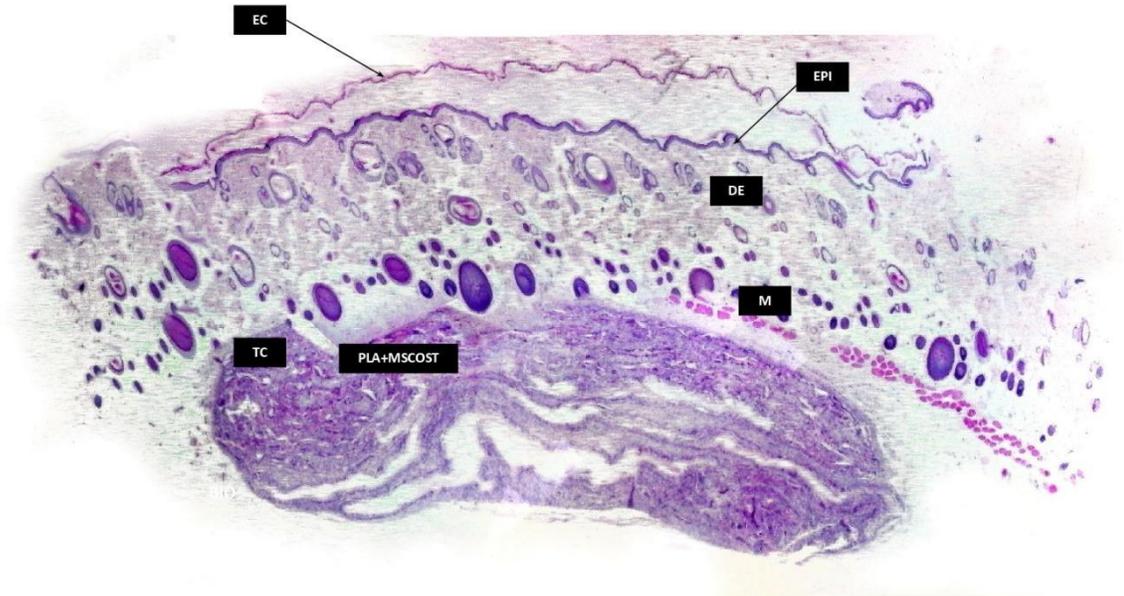


FIGURA 33. Muestra de piel teñida con H & E, tomada al 10X, estructuras del corte Histológico

EP (Epidermis), EC (Estrato Córneo), FP (Folículo Piloso), DE (Dermis), M (Músculo), TC (Tejido Conectivo).

En el área externa se observa la epidermis intacta y en la periferia el estrato córneo intacto. En el área interna se observa la dermis folículos pilosos, con glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas y en la hipodermis se observa tejido muscular. Debajo del tejido conectivo se observa el área del biomaterial (PLA+MSCost), sin reacción inflamatoria o granulomatosa, no hay degradación y no se observan las capas del biomaterial. (FIGURA 33).

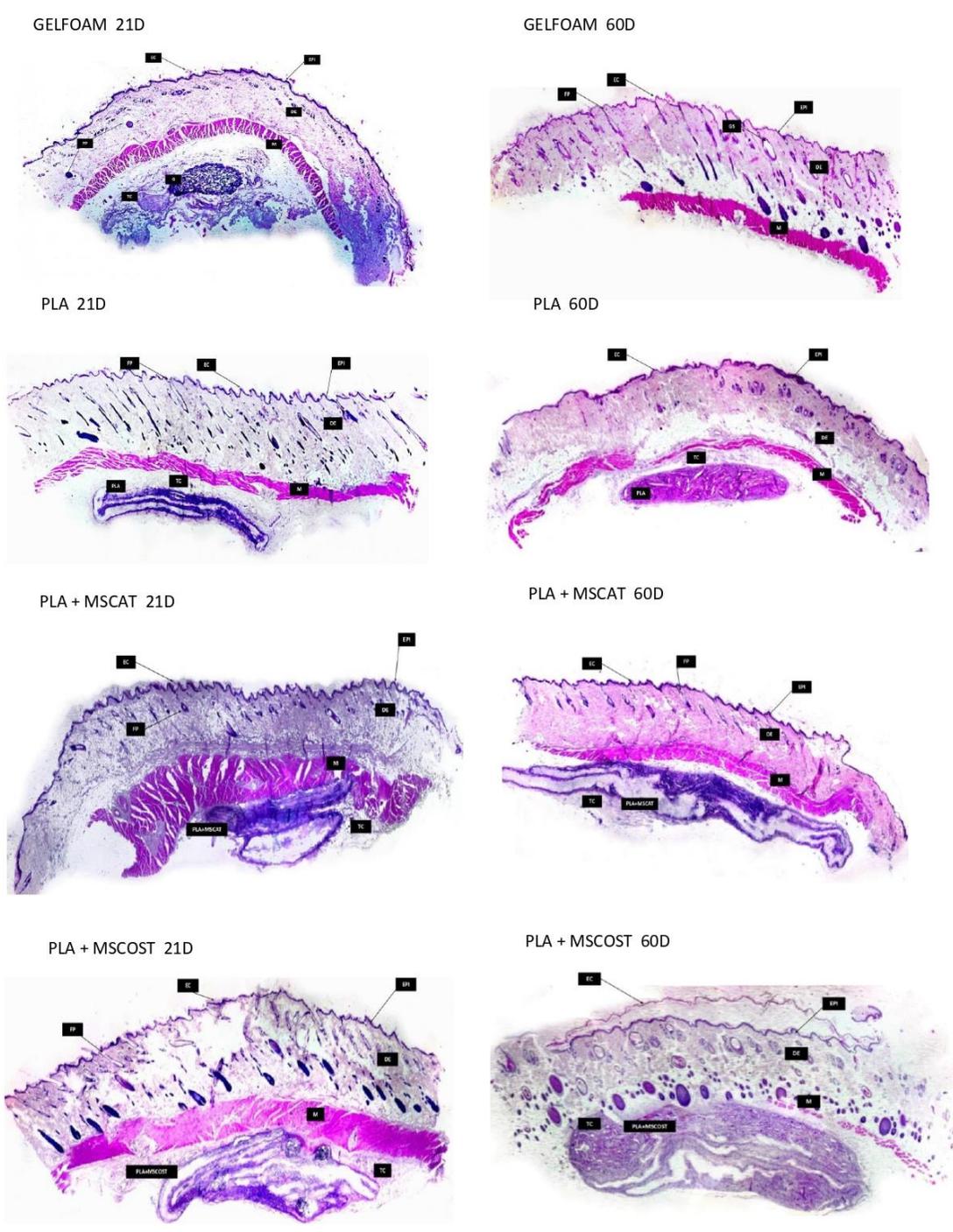


FIGURA 34. Muestras de grupos de piel teñida con H & E, tomada al 10X, estructuras del corte Histológico.

4. Resultados Histológicos Tricrómico de Masson.

Se analizaron las muestras de piel obtenidas. Se comparó la histología entre los grupos GELFOAM, PLA, PLA+MSCAT y PLA+MSCOST, los cuales fueron cortados siguiendo el eje longitudinal del tejido y teñidos con la técnica de Tricrómico de Masson, en la que se distinguen las fibras de colágena, cuando estas se tiñen intensamente son fibras de colágena que darán el soporte para la osificación.

GELFOAM 21D

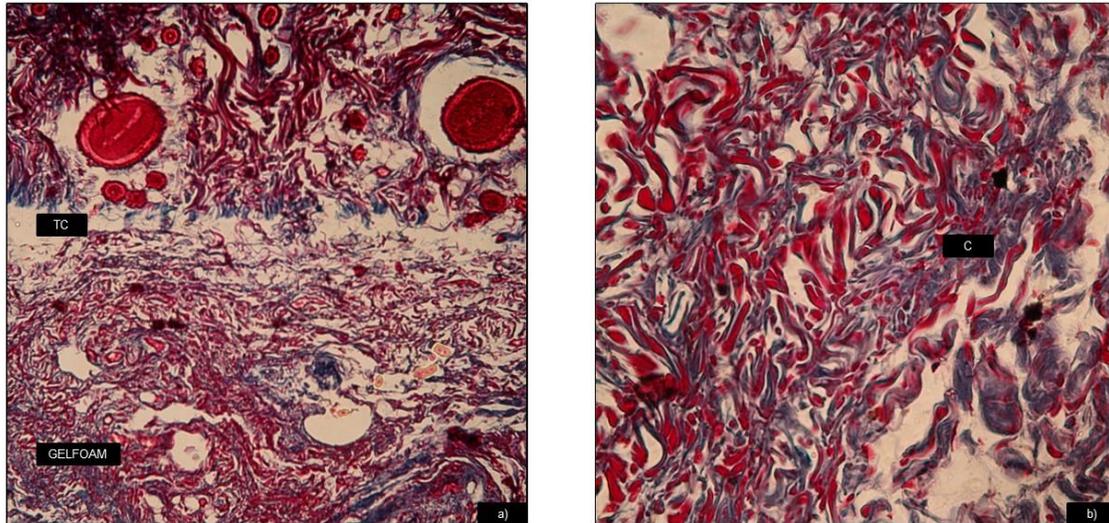


FIGURA 35. Muestra de piel teñida con Tricrómico de Masson, a) tomada al 10x, b) Tomada al 40x, estructuras del corte Histológico. TC (Tejido Conectivo), GELFOAM, C (Colágeno).

Se observan las fibras de colágeno dispuestas de manera continua, y en distintas direcciones dentro del tejido nuevo. A mayor aumento se observan paquetes de colágeno dispuestos de manera indefinida en el espacio en donde se realizó el implante del constructo en el tejido conectivo (FIGURA 35).

GELFOAM 60D

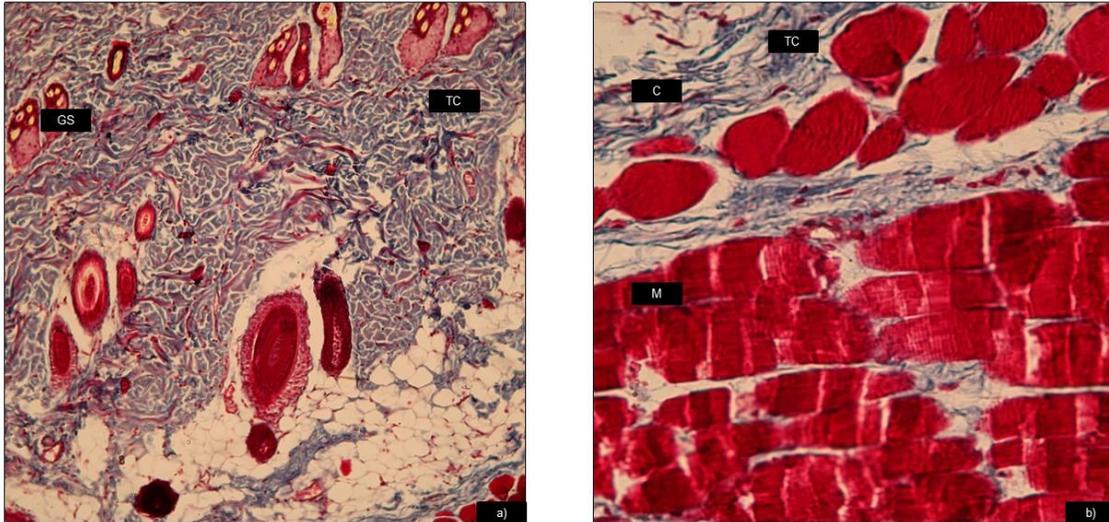


FIGURA 36. Muestra de piel teñida con Tricrómico de Masson, a) tomada al 10x, b) Tomada al 40x, estructuras del corte Histológico: TC (Tejido Conectivo), GELFOAM, C (Colágeno), M (Músculo), GS (Glándulas Sebáceas).

Como se observó en los resultados con H & E, no se observa presencia del biomaterial, en el tejido solo se observa el tejido muscular definido con los haces musculares completos (FIGURA 36).

PLA 21D

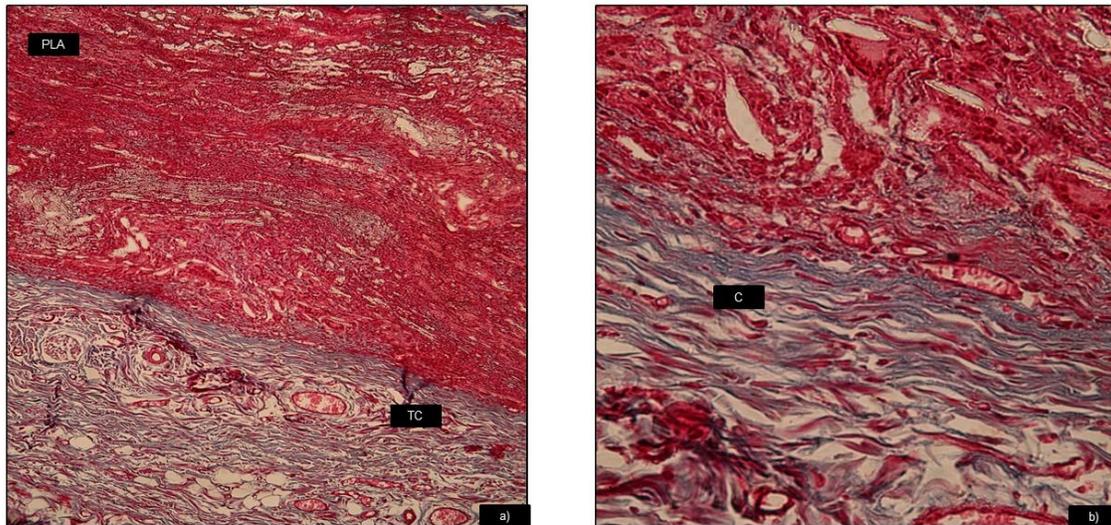


FIGURA 37. Muestra de piel teñida con Tricrómico de Masson, a) tomada al 10x, b) Tomada al 40x, estructuras del corte Histológico. TC (Tejido Conectivo), PLA, C (Colágeno).

Se observan las tres capas del biomaterial, de manera poco nítida y está poblado por gran cantidad de células, en su conjunto está teñido, de azul lo que indica que el tejido conectivo a su alrededor está integrado por haces de colágena.

A gran aumento se observan lagunas del biomaterial rodeado por gran cantidad de células y solo hay tejido conectivo a su alrededor, se observan haces de colágena longitudinales, pocos, que se tiñen de azul (FIGURA 37).

PLA 60D

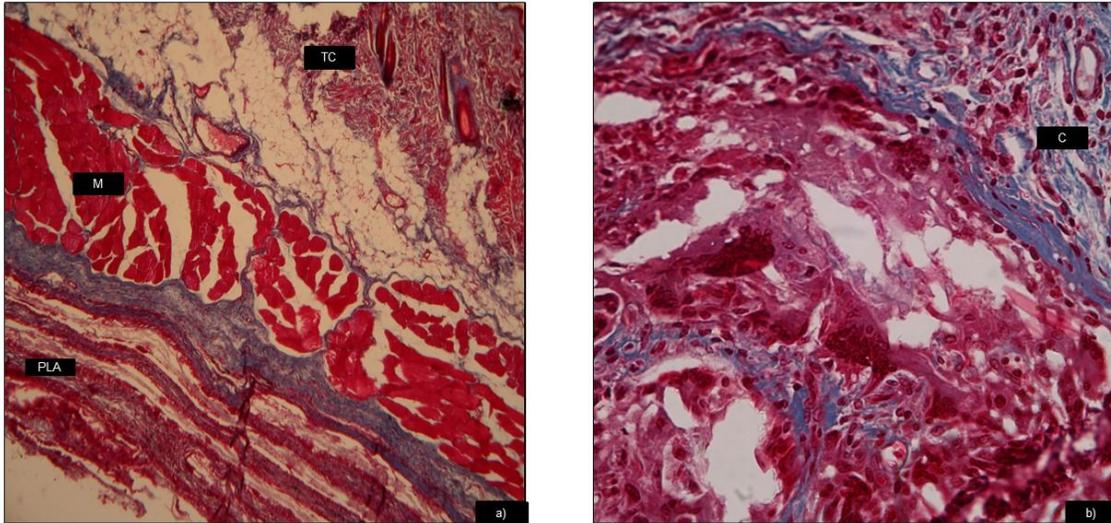


FIGURA 38. Muestra de piel teñida con Tricrómico de Masson, a) tomada al 10x, b) Tomada al 40x, estructuras del corte Histológico. TC (Tejido Conectivo), PLA, C (Colágeno), M (Músculo)

Se observan claramente las tres capas del biomaterial que no está del todo integrado al tejido, alrededor del mismo el tejido conectivo se tiñe color azul lo que indica la formación de colágeno, la capa de este tejido que está entre el constructo y el músculo se observa más gruesa que en el resto de los grupos, a gran aumento se observan células multinucleadas de gran tamaño que quizás se están encargando de la reabsorción del biomaterial en márgenes distantes del biomaterial se observa el tejido conectivo que está ampliamente poblado por células mononucleares (FIGURA 38).

PLA + MSCAT 21D

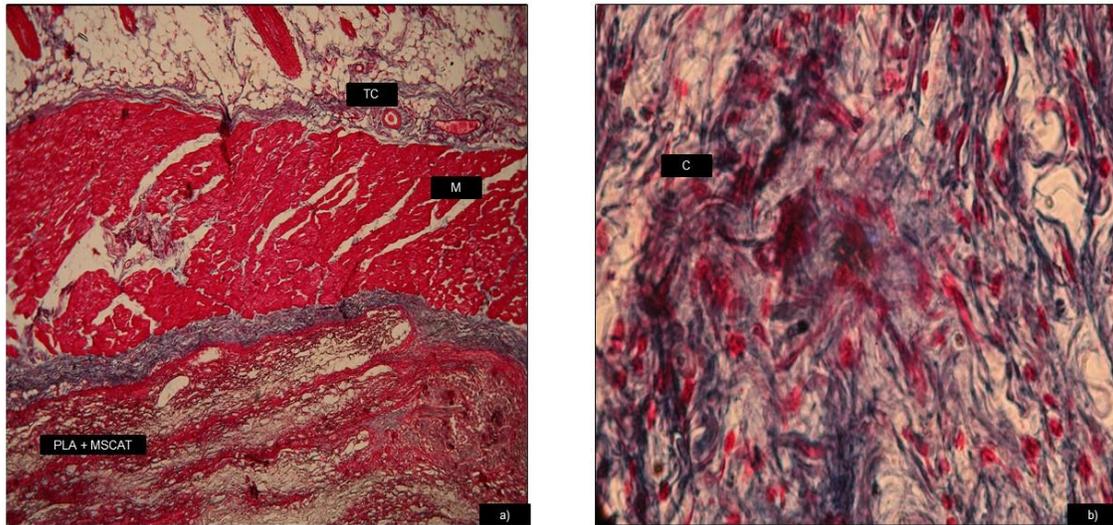


FIGURA 39. Muestra de piel teñida con Tricrómico de Masson, a) tomada al 10x, b) Tomada al 40x, estructuras del corte Histológico. TC (Tejido Conectivo), PLA + MSCAT, C (Colágeno), M (Músculo).

Se observan claramente las tres capas del constructo, con tejido conectivo con colágeno entre cada una de las capas, solo en la capa de tejido conectivo que separa del músculo, a gran aumento es evidente observar estas fibras de tejido conectivo desorganizado con células visibles. (FIGURA 39).

PLA + MSCAT 60D

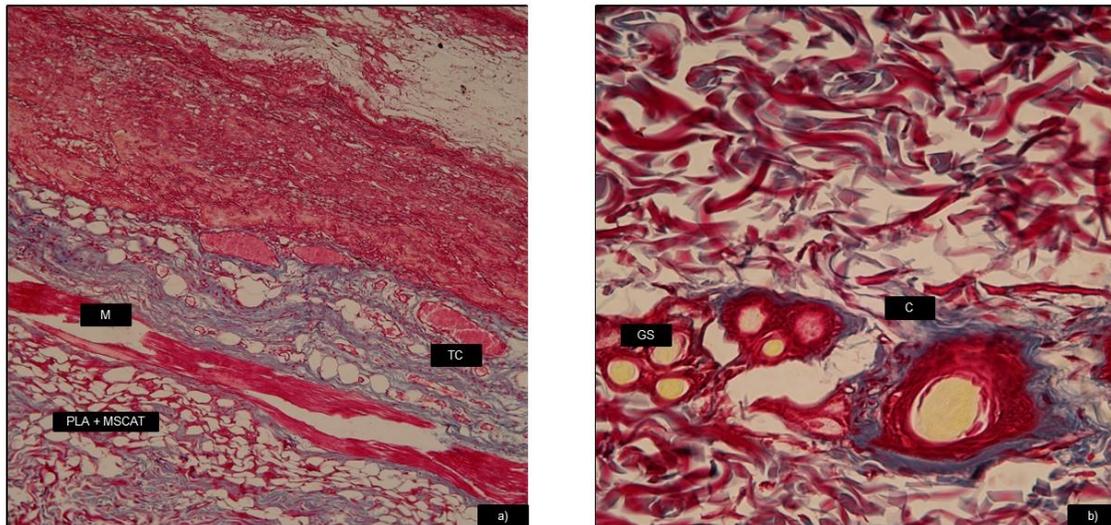


FIGURA 40. Muestra de piel teñida con Tricrómico de Masson, a) tomada al 10x, b) Tomada al 40x, estructuras del corte Histológico. TC (Tejido Conectivo), M (Músculo), C (Colágeno), PLA + MSCAT, GS (Glándulas Sebáceas).

Se observa parte del biomaterial y alrededor grandes espacios de tejido conectivo que en su mayoría están constituidos por colágena, en el tejido conectivo alrededor del biomaterial hay espacios ocupados por tejido adiposo. A gran aumento se observan las fibras de colágeno dispuestas aun de forma poco organizada teñido de azul, lo que indica la presencia de colágena. (FIGURA 40).

PLA + MSCOST 21D

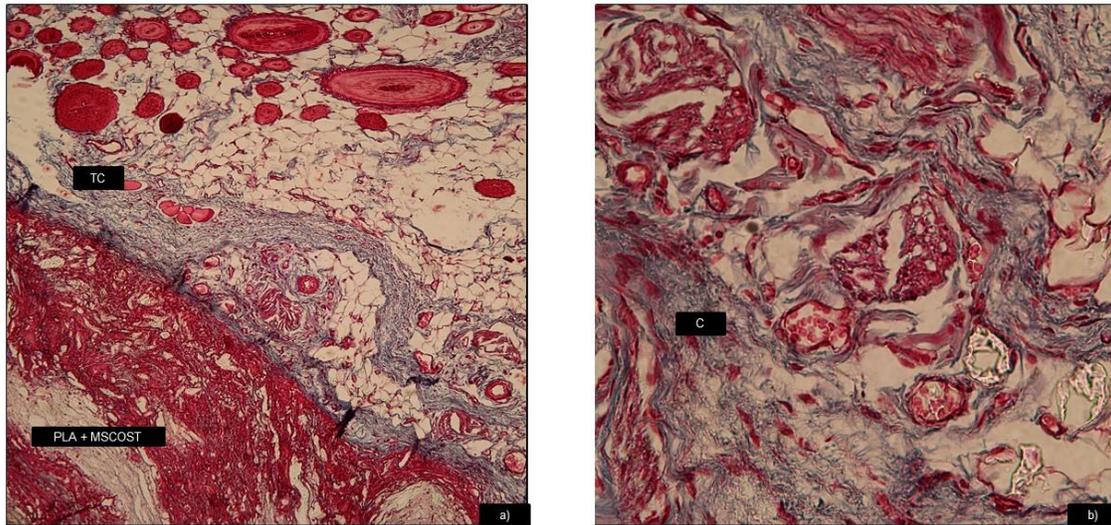


FIGURA 41. Muestra de piel teñida con Tricrómico de Masson, a) tomada al 10x, b) Tomada al 40x, estructuras del corte Histológico. TC (Tejido Conectivo), PLA + MSCOST, C (Colágeno).

Se observan las capas del constructo que está integrado en el tejido, el tejido conectivo que lo rodea se encuentra parcialmente teñido de azul que nos indica la presencia de colágena madura, en este tejido conectivo se observan espacios que están ocupados por tejido adiposo; a gran aumento ya se observa la organización de los haces de colágena dispuestos longitudinalmente (FIGURA 41).

PLA + MSCOST 60D

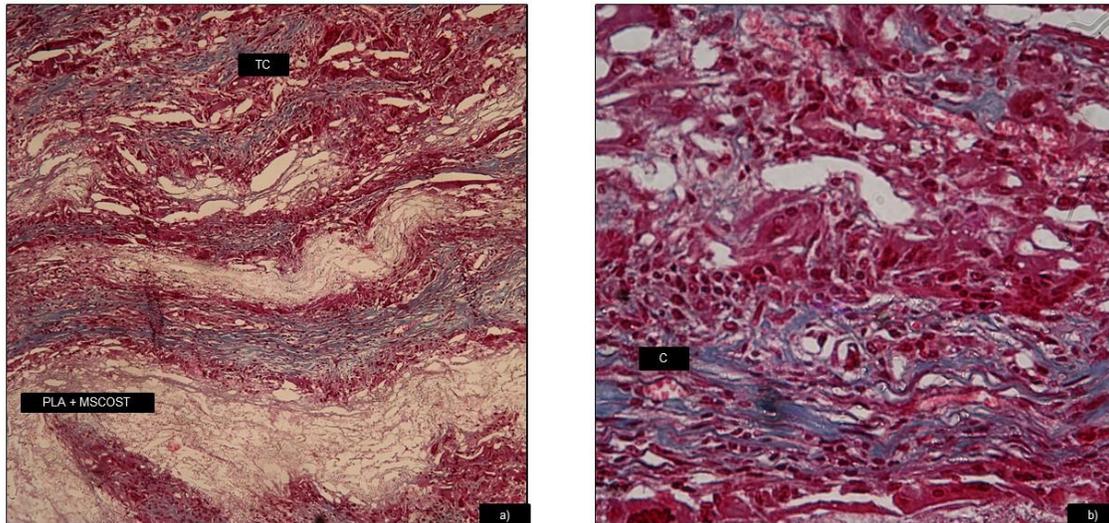
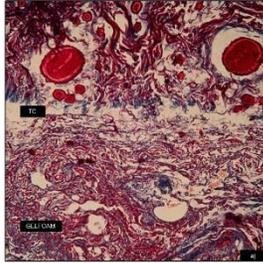


FIGURA 42. Muestra de piel teñida con Tricrómico de Masson, a) tomada al 10x, b) Tomada al 40x, estructuras del corte Histológico. TC (Tejido Conectivo), PLA + MSCOST, C (Colágeno).

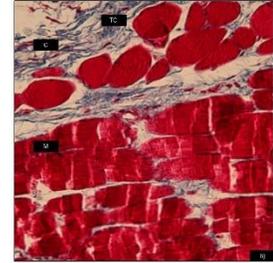
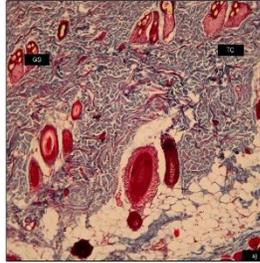
Se observan las tres capas del constructo elaborado con PLA, que están integradas al tejido conectivo, que se ha teñido de azul, lo que indica presencia de colágeno a gran aumento es posible ver el tejido conectivo organizado, nuevamente con la presencia de colágeno madura y la formación de pequeños vasos sanguíneos, no se observa encapsulamiento del biomaterial que tiene a su alrededor algunas células de gran tamaño y numerosos núcleos. Los haces de colágeno se observan organizados y sus fibras se ven longitudinales al tejido (FIGURA 42).

}

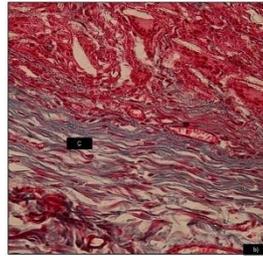
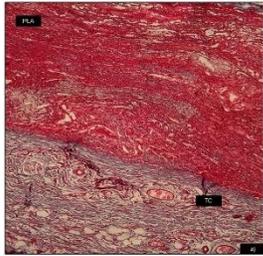
GELFOAM 21D



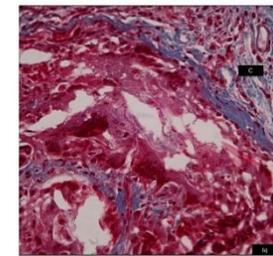
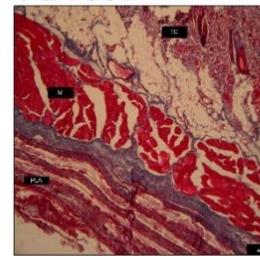
GELFOAM 60D



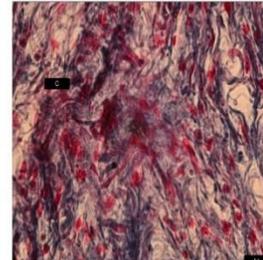
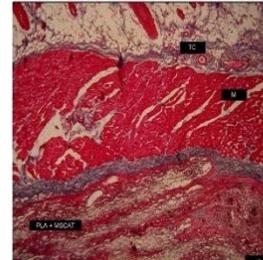
PLA 21D



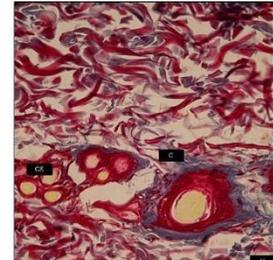
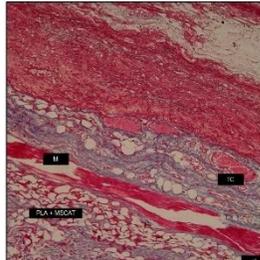
PLA 60D



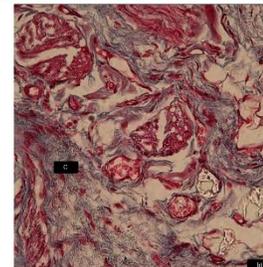
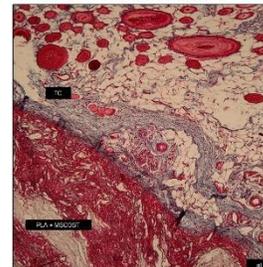
PLA + MSCAT 21D



PLA + MSCAT 60D



PLA + MSCOST 21D



PLA + MSCOST 60D

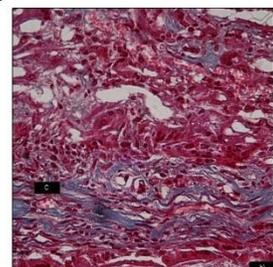
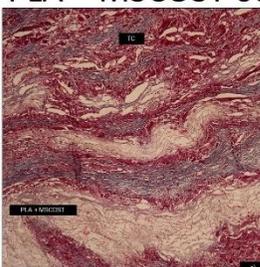


FIGURA 43. Muestras de grupos de piel teñida con Tricrómico de Masson, tomada al 10X y 40X estructuras del corte Histológico.

DISCUSIÓN

El biomaterial que empleamos está hecho de PLA 10% específicamente; este biomaterial ya ha demostrado ser compatible con los tejidos en los que se ha implantado, en los que no se observó daño, (Gabriela, 2020) (Vladimir, 2017), en el caso de nuestro estudio histológicamente observamos la sobrevivencia y proliferación de las células MSCat entre las capas del biomaterial, que se integró adecuadamente al tejido.

En sus estudios Tajbakhsh y Shen y colaboradores (Tajbakhsh, 2017), (Shen, 2016). contribuyeron con describir las 4 características fundamentales que debe tener un biomaterial para poder contribuir a la regeneración tisular, en nuestro estudio se demostró que el biomaterial las posee: su estructura tridimensional permitió la sobrevivencia y proliferación de las MSCat; se observó compatibilidad con los tejidos de nuestras ratas vivas y demostró que se reabsorbe, aunque no completamente a los 60 días, si hay un porcentaje de más del 60% que se absorbió, este grado de reabsorción es deseable. Demostró poseer propiedades mecánicas adecuadas para poder ser usado como relleno y como andamio en el constructo tisular.

Por su parte, las MSCat son células (Gebler, 2012), que han demostrado ser altamente regeneradoras por la cantidad de citoquinas que participan en ellas, que les aportan capacidades inmunomoduladoras, así como de angiogénesis, y que esto se observa en las muestras histológicas en las que hay formación de micro vasos sanguíneos alrededor del biomaterial, tanto como a los 21 días, como a los 60 días. Las Células Troncales Mesenquimales de Tejido Adiposo (MSCat), cumplen con los criterios que postuló la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, International Society Cellular Therapy) (Rodríguez, 2010) para denominarlas Células Troncales Mesenquimales (CSM).

La unión del PLA 10% con células de tipo mesenquimal ya ha sido previamente estudiado (Alvarez,2009) y quedó demostrado que al igual que otros autores (Reddy,2021), la unión de nuestras células de tipo mesenquimal, en este caso las MSCat, son una excelente opción para ser sembradas diferenciadas o no diferenciadas dentro del biomaterial PLA 10%, en nuestros hallazgos histológicos observamos que las MSCat no solo sobrevivieron dentro del biomaterial, sino que además proliferaron y contribuyeron a que los tejidos circundantes toleraran la presencia del constructo.

En nuestro grupo control, se decidió emplear Gelfoam, ya que es un material inocuo que se sabe que al ser una esponja de gelatina sería bien tolerada por los tejidos, no causaría daño y su reabsorción completa se daría al término entre 4 y 6 semanas.

Un biomaterial de injerto eficaz en la regeneración ósea requiere una resistencia mecánica favorable, resistencia a la degradación y potencial osteoinductor (Gy,2022). Podemos decir que nuestro biomaterial adquirió resistencia mecánica al ser una tricapa, además posee resistencia a la degradación en nuestro resultado se mantiene hasta los 60 días, y el potencial osteoinductor, lo pueden otorgar las células osteodiferenciadas.

Como sabemos, la inflamación es una respuesta inicial esencial para la cicatrización y regeneración de los tejidos; la eliminación de desechos e infecciones puede provocar una respuesta de inflamación prolongada, lo que conlleva a un retraso en la reparación/regeneración de los tejidos, el rechazo del biomaterial, daño tisular y un aumento de la cicatrización y fibrosis. Los biomateriales implantados son, por definición, cuerpos extraños, por ello, se debe limitar la respuesta inflamatoria provocada. Además, las respuestas inmunitarias favorables pueden modularse mediante diseños de biomateriales que ejercen respuestas anti inflamatorias y pro regenerativas (Lynch,202). En el caso de nuestro constructo, el diseño del biomaterial permitió observar una respuesta inflamatoria inicial esperada (hasta los 7 días) y luego de ello, ya no presentaba inflamación en los tejidos observados histológicamente.

En la primera parte de los resultados de la presente tesis se realizaron tinciones con H&E, en las que la hematoxilina se unió a estructuras aniónicas (la cromatina y los núcleos) tiñéndose de morado. La Eosina como colorante ácido tiñó los citoplasmas y la matriz extracelular y fibras colágenas en un color rosa. Se observó, de manera general, que los grupos que tenían en su estructura PLA, el constructo permaneció en el sitio de implante y, en el caso de los constructos sembrados, PLA+ MSCat y PLA+MSCost entre las capas del biomaterial se encontraron células mononucleares que presumiblemente son las células sembradas, que mejoraron las propiedades del constructo y permitieron su integración a los tejidos, también se observaron células multinucleadas similares en su morfología a macrófagos, lo cual es favorable, pues se considera que la presencia de los macrófagos M2 denominados comúnmente como macrófagos de "cicatrización de heridas" es favorable para la regeneración de tejido (Lynch,2022). En todos los casos, no se observaron respuestas negativas como aumento de la inflamación, o inflamación prolongada, encapsulación fibrosa, rechazo del implante y/o respuesta a cuerpo extraño.

El PLA como lo dispusimos, en tricapa, tridimensional, imito a la matriz extracelular lo que contribuyó a proteger a nuestras células troncales sembradas del impacto ambiental experimentado durante el trasplante de células troncales y fomentó la diferenciación para promover la regeneración de tejido nuevo (Kumbar,2008).

Mediante la tinción de tricrómico de Masson, observamos la colágena en una coloración de azul a verde, que es la proteína más importante de la matriz extracelular y es indicativa de los procesos de regeneración que se llevan a cabo en los tejidos, por ello, es importante detectarla en las tinciones histológicas a fin de conocer su estado fisiológico (De Gante, 2008), que en el caso de nuestras muestras se tiñó más azul, señal de un colágeno más maduro, en el grupo

PLA+MSCost, en donde, además, además se observaron las fibras de colágena de una más manera más estructurada que en el resto de los grupos

La función de la colágena en la dermis es proporcionar masa y fuerza estructural, su papel en la regeneración radica en que actúa como soporte de los nuevos tejidos en desarrollo; la colágena de tipo 1 está presente en el hueso y en la dermis reticular; en la técnica de tricrómico de Masson se distinguen las fibras de colágena, que forman parte del soporte tisular, en este caso se observó en la dermis, pero creemos que en el grupo con MSCost, podría dar lugar a la formación de tejido osteoide y luego, óseo, ya que en estos grupos, el tejido intensamente teñido de azul, indica que se está formando un tejido nuevo tejido estructurado, que probablemente dará lugar a un nuevo tejido osteoide.

Los biomateriales que se degradan a medida que el tejido se regenera alrededor, como en el caso de nuestro constructo, se denominan reemplazos de tejido isomorfo (Feldman,2019) y están en camino de convertirse en los próximos biomateriales "inteligentes", ya que además de que los polímeros como el PLA promueven la curación y tienen como ventajas su bajo costo y biodisponibilidad, las células sembradas en ellos les permitieron tener un alto grado de biocompatibilidad (Kumbar,2008).

CONCLUSIONES

La respuesta inflamatoria encontrada fue en un mayor porcentaje leve hasta los 7 días, después de los 14 días ya no se observó inflamación alguna

Al término de los 60 días el constructo de PLA, PLA + MSCat y PLA + MSCost fue degradado en un 60%. Lo que nos permite concluir que nuestro constructo tridimensional de PLA 10% resultó ser reabsorbible y biocompatible en donde fue implantado.

BIBLIOGRAFÍA

Abdanipour, A., Tiraihi, T., & Delshad, A. (2011). Trans-differentiation of the adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells expressing neurotrophins by selegiline. *Iranian Biomedical Journal*, 15(4), 113.

Ahuja, R., Kumari, N., Srivastava, A., Bhati, P., Vashisth, P., Yadav, P. K., Jacob, T., Narang, R., & Bhatnagar, N. (2020). Biocompatibility analysis of PLA based candidate materials for cardiovascular stents in a rat subcutaneous implant model. *Acta histochemica*, 122(7), 151615. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2020.151615>

Álvarez Barreto, José F. (2009). Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2), 98-109. [fecha de Consulta 11 de agosto de 2021]. ISSN: 1856-9161. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179214945008>

Barón Zárate-Kalfópulos, Reyes Alejandro-Sánchez. Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cir Ciruj* 2006;74: 217-22.

De Gante, A. D., & Villaseñor, C. K. T. (2008). Estudio y detección de colágena de la matriz extracelular (MEC) mediante técnicas de tinción específicas. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar*, (7), 8.

Estrada Hernández, Mónica Gabriela, sustentante Evaluación de un constructo hecho mediante ingeniería de tejidos en un modelo de osteoporosis / 2020

Feldman, D. S. (2019). Biomaterial enhanced regeneration design research for skin and load bearing applications. *Journal of Functional Biomaterials*, 10(1), 10.

Gebler, A., Zabel, O., & Seliger, B. (2012). The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends in molecular medicine*, 18(2), 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.10.004>

Granados, M. V., Montesinos-Montesinos, J. J., & Álvarez-Pérez, M. A. (2017). Adhesión y proliferación de las células troncales mesenquimales de médula ósea en andamios fibrilares de poli (ácido L-láctico) (PLA). *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, 38(1), 288-296.

Granados-Hernández, M. V., Serrano-Bello, J., Montesinos, J. J., Alvarez-Gayosso, C., Medina-Velázquez, L. A., Alvarez-Fregoso, O., & Alvarez-Perez, M. A. (2018). In vitro and in vivo biological characterization of poly (lactic acid) fiber scaffolds synthesized by air jet spinning. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 106(6), 2435-2446.

Gu, J. T., Jiao, K., Li, J., Yan, J. F., Wang, K. Y., Wang, F., ... & Niu, L. N. (2022). Polyphosphate-crosslinked collagen scaffolds for hemostasis and alveolar bone regeneration after tooth extraction. *Bioactive materials*, 15, 68-81.

Guerrero, F. (2016). Uso de la matriz derivada del esmalte (Emdogain®) combinada con hidroxiapatita bovina (Nukbone®) y barrera con esponja de colágeno polivinilpirrolidona (Fibroquel®) en cirugía periapical: reporte de un caso clínico. *Oral*, 55(17), 1412-1417. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2016/ora1655f.pdf>.

Hao, W. D. (2010). Enhanced bone formation in large segmental radial defects by combining adipose - derived stem cells expressing bone morphogenetic protein 2 with nHA/RHLC/PLA scaffold. *International orthopaedics*, 34 (8), 1341-1349.

Hu, L. Y. (2018). Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. *International journal of molecular sciences*, 19 (2),360.

Kumbar, S. G., James, R., Nukavarapu, S. P., & Laurencin, C. T. (2008). Electrospun nanofiber scaffolds: engineering soft tissues. *Biomedical materials*, 3(3), 034002.

Lee, S., Chae, D. S., Song, B. W., Lim, S., Kim, S. W., Kim, I. K., & Hwang, K. C. (2021). ADSC-Based Cell Therapies for Musculoskeletal Disorders: A Review of Recent Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10586

Linero, Itali M, Doncel, Adriana, & Chaparro, Orlando. (2014). Proliferación y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales en hidrogeles de plasma sanguíneo humano. *Biomédica*, 34(1), 67-78. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i1.1465>

López, C., Manchola, J., Medina-Cárdenas, S., & Moreno, S. (2016). Reacción granulomatosa de tipo cuerpo extraño secundaria a biomateriales y su respuesta inmunológica: Revisión sistemática de la literatura. *Salutem Scientia Spiritus*, 2(1). Recuperado a partir de <https://revistas.javerianacali.edu.co/index.php/salutemscientiaspiritus/article/view/1385>

Lydia N. Melek (2015). Tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction, *Tanta Dental Journal*, Volume 12, Issue 3, Pages 211-223, ISSN 1687-8574, <https://doi.org/10.1016/j.tdj.2015.05.003>.

Lynch, R. I., & Lavelle, E. C. (2022). Immuno-modulatory biomaterials as anti-inflammatory therapeutics. *Biochemical pharmacology*, 114890.

Martínez Álvarez, O, Barone, A, Covani, U, Fernández Ruíz, A, Jiménez Guerra, A, Monsalve Guil, L, & Velasco Ortega, E. (2018). Injertos óseos y biomateriales en implantología oral. *Avances en Odontostomatología*, 34(3), 111-119. Recuperado en 11 de agosto de 2021, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852018000300002&lng=es&tlng=es.

Medina Cárdenas, S. (2016). Cambios tisulares producidos por la implantación subcutánea de un microchip RFDI pasivo recubierto parcialmente con Parylene C en piel de rata Wistar.

Melek, L. N. (2015). Tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction. *Tanta DentaJournal*, 12(3), 211-223

Meruane N, Manuel, & Rojas R, Mariana. (2011). Células troncales derivadas del tejido adiposo: Técnica de obtención y utilidad en cirugía. *Revista chilena de cirugía*, 63(2), 223-228. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-40262011000200017>

Miranda Rodriguez, A., Galván Cabrera, J., & de León Delgado, J. (2014). Propiedades inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 31(1). Recuperado de <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/221/155>

Miron, R. J., & Zhang, Y. F. (2012). Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *Journal of dental research*, 91(8), 736–744. <https://doi.org/10.1177/0022034511435260>

Monroy, C. M., Cortés, A. C., Sicard, D. M., & de Restrepo, H. G. (2005). Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica*, 25(3), 335-45. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v25i3.1358>

Muñoz, Yoel Orozco, Pérez, Betty Cruz, Calaña Domínguez, Yuliet. (2020). La aplicación de factores de crecimiento en el desarrollo de la Ingeniería de tejidos óseos. *Medicentro Electrónica*, 24(4), 785-804. E 01

de octubre de 2020. Recuperado en 31 de julio de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432020000400785&lng=es&tlng=es.

Parrales Pincay, K. R. (2018). Preservación del alveolo post-exodoncia mediante el uso de sulfato de calcio (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil.Facultad Piloto de Odontología

Perán, M., García, M. A., Lopez-Ruiz, E., Jiménez, G., & Marchal, J. A. (2013). How Can Nanotechnology Help to Repair the Body? Advances in Cardiac, Skin, Bone, Cartilage and Nerve Tissue Regeneration. *Materials (Basel, Switzerland)*, 6(4), 1333–1359. <https://doi.org/10.3390/ma6041333>

Raspall, G. (2006) Cirugía oral e implantología.Madrid, España: Panamericana. Obtenido de <https://books.google.com.mx/books?id=CNzlos2loHAC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=true>

Reddy, M. S. B., Ponnamma, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. K. (2021). A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds. *Polymers*, 13(7), 1105.

Rodríguez-Pardo, Viviana Marcela, Fuentes-Lacouture, Maria Fernanda, Aristizabal-Castellanos, Jose Alejandro, & Vernot Hernandez, Jean Paul. (2010). Aislamiento y caracterización de células "stem" mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. *Universitas Scientiarum*, 15(3), 224-239. Retrieved July 30, 2021, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-74832010000300004&lng=en&tlng=es.

Shalumon, K. T., Sathish, D., Nair, S. V., Chennazhi, K. P., Tamura, H., & Jayakumar, R. (2012). Fabrication of aligned poly(lactic acid)-chitosan nanofibers by novel parallel blade collector method for skin tissue engineering. *Journal of biomedical nanotechnology*, 8(3), 405–416. <https://doi.org/10.1166/jbn.2012.1395>

Shen, X., Zhang, Y., Gu, Y., Xu, Y., Liu, Y., Li, B., & Chen, L. (2016). Sequential and sustained release of SDF-1 and BMP-2 from silk fibroin-nanohydroxyapatite scaffold for the enhancement of bone regeneration. *Biomaterials*, 106, 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.08.023>

Tajbakhsh, S., & Hajiali, F. (2016). A comprehensive study on the fabrication and properties of biocomposites of poly (lactic acid)/ceramics for bone tissue engineering. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 70(Pt 1), 897–912. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.008>

Tsou, C. H. (2015). Biocompatibility and characterization of polylactic acid/styrene-ethylene- butylene - styrene composites. *Bio-medical materials and engineering*, 26(1), S147-S154

Walsh, S. J. (2001). High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis.*Rheumatology*, 40 (1), 7-83.

Whang PG, Wang JC. (2003) Bone graft substitutes for spinal fusion. *Spine J* 2003; 3:155-165 [https://doi.org/10.1016/S1529-9430\(02\)00539-9](https://doi.org/10.1016/S1529-9430(02)00539-9)

Soto Góngora, Sergio, & Taxis González, Miriam Guadalupe. (2004). Injertos óseos: Una alternativa efectiva y actual para la reconstrucción del complejo cráneo-facial. *Revista Cubana de Estomatología*, 42(1) Recuperado en 21 de septiembre de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072005000100005&lng=es&tlng=es.

Xiao, Xiao, L. W. (2012). Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. *Biomedical Science, Engineering and Technology*, 24-282. doi:10.5772/23927

Yamachika, E., & Iida, S. (2013). Bone regeneration from mesenchymal stem cells (MSCs) and compact bone-derived MSCs as an animal model. *Japanese Dental Science Review*, 49(1), 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2012.11.003>

Bibliografía Figuras:

Figura 1: **Álvarez Barreto, José F.** (2009). Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2),98-109. [fecha de Consulta 11 de agosto de 2021]. ISSN: 1856-9161. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179214945008>

FIGURA 2: **Fernández Moraleda Belén** (2013). Optimización de materiales para regeneración ósea. Estudio de las interacciones de hidroxiapatita con proteínas y preparación de andamios porosos, Universidad Complutense de Madrid.

FIGURA 3: **Anderson JM** (2001). Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res*; 31:81-110. DOI: 10.1146/annurev.matsci.31.1.81.

FIGURA 4: **Edwards PC, Fantasia JE** (2007) Review of long-term adverse effects associated with the use of chemically-modified animal and nonanimal source hyaluronic acid dermal fillers; 2(4):509-19

FIGURA 5: **SIVEPAB** (2019). Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales, Recuperada el 26 de mayo del 2022 de: <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-sivepab-2019>

ANEXOS

1. Aval de comisión de ética.



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala
COMISIÓN DE ÉTICA



Los Reyes Iztacala a **06/11/2019**

Oficio: **CE/FESI/112019/1333**

DRA. TREJO IRIARTE CYNTHIA GEORGINA

Presente:

En atención a su solicitud de aval, por la Comisión de Ética de esta facultad, para su proyecto denominado **“BIOCOMPATIBILIDAD DE UN CONSTRUCTO TRIDIMENSIONAL DE PLA PARA SU USO EN INGENIERÍA DE TEJIDOS”**., que va a someter a **TESIS de licenciatura de la carrera de Cirujano Dentista, de la alumna: Itzel Arreola Esquivel.**

Esta comisión acordó la siguiente opinión técnica:

Avalado sin recomendaciones

Con vigencia del **1 de diciembre del 2019** al **3 de marzo del 2021.**

Sin otro particular por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración y aprovechamos la oportunidad para enviarle un atento saludo y nuestro respeto académico.

Atentamente

M. en C. María Eugenia Isabel Heres y Pulido
Presidente



2. Aval de comisión de bioseguridad.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
Comisión de Bioseguridad



DRA. TREJO IRIARTE CYNTHIA GEORGINA
PRESENTE

Por este medio informo a Usted que su proyecto:

“BIOCOMPATIBILIDAD DE UN CONSTRUCTO TRIDIMENSIONAL DE PLA PARA SU USO EN INGENIERÍA DE TEJIDOS”.

que será sometido a la convocatoria: TESIS de licenciatura (carrera de Cirujano Dentista) de la alumna: Itzel Arreola Esquivel .

Cumple con los requisitos establecidos por las leyes y normas en materia de Bioseguridad, razón por la cual se avala para su desarrollo.

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU

Los Reyes Iztacala, a los 5 días del mes de noviembre del 2019

Biol. MUÑOZ LOPEZ JOSE LUIS
Presidente



3. Tabla de registros de inflamación 60 días. (PLA, PLA + MSCat, PLA + MSCost, Gelfoam).

		INFLAMACIÓN				
		7 DÍAS	SEVERA +++	MODERADA ++	LEVE +	NULO 0
	TERAPIA	PLA + MSCOST	PLA	GELFOAM	PLA + MSCAT	
HEMBRAS						
1	R. 225	+	+	0	0	
2	R. 226	0	++	0	0	
3	R. 227	0	0	0	+	
4	R. 228	0	0	0	+	
5	R. 229	++	+	0	0	
6	R. 230	+	0	+	0	
7	R. 231	0	0	+	0	
8	R. 232	0	0	0	0	
9	R. 233	++	0	0	0	
10	R. 234	+	0	0	0	
MACHOS						
1	R. 235	0	0	0	0	
2	R. 236	+	0	+	+	
3	R. 237	++	0	+	+	
4	R. 238	++	0	0	+	
5	R. 239	++	0	0	0	
6	R. 240	+	0	+	0	
7	R. 241	FALLECIO				
8	R. 242	0	0	+	0	
9	R. 243	++	0	0	0	
10	R. 244	++	0	0	0	

		INFLAMACIÓN				
		10 DÍAS	SEVERA +++	MODERADA ++	LEVE +	NULO 0
	TERAPIA	PLA + MSCOST	PLA	GELFOAM	PLA + MSCAT	
HEMBRAS						
1	R. 225	+	0	0	0	
2	R. 226	0	0	+	0	
3	R. 227	0	+	0	0	
4	R. 228	0	0	0	+	
5	R. 229	+	0	0	0	
6	R. 230	0	0	0	0	
7	R. 231	+	0	0	0	
8	R. 232	0	0	0	0	
9	R. 233	+	0	0	0	
10	R. 234	0	+	0	0	
MACHOS						
1	R. 235	0	0	0	+	
2	R. 236	+	+	+	+	
3	R. 237	+	0	+	0	
4	R. 238	0	0	0	0	
5	R. 239	0	+	+	0	
6	R. 240	+	0	++	0	
7	R. 241	FALLECIO				
8	R. 242	+	+	0	0	
9	R. 243	+	0	0	0	
10	R. 244	++	+	+	0	

		INFLAMACIÓN				
		15 DÍAS	SEVERA +++	MODERADA ++	LEVE +	NULO 0
	TERAPIA	PLA + MSCOST	PLA	GELFOAM	PLA + MSCAT	
HEMBRAS						
1	R. 225	+	0	0	0	
2	R. 226	+	0	+	0	
3	R. 227	+	0	0	0	
4	R. 228	0	0	0	0	
5	R. 229	+	0	0	0	
6	R. 230	0	0	0	0	
7	R. 231	+	+	0	0	
8	R. 232	+	+	+	0	
9	R. 233	+	+	0	0	
10	R. 234	+	+	0	0	
MACHOS						
1	R. 235	+	0	0	0	
2	R. 236	+	+	+	0	
3	R. 237	+	0	+	0	
4	R. 238	+	0	0	0	
5	R. 239	+	+	0	0	
6	R. 240	+	+	+	0	
7	R. 241	FALLECIO				
8	R. 242	+	+	0	0	
9	R. 243	+	+	+	0	
10	R. 244	0	+	0	0	

		INFLAMACIÓN				
		20 DÍAS	SEVERA +++	MODERADA ++	LEVE +	NULO 0
	TERAPIA	PLA + MSCOST	PLA	GELFOAM	PLA + MSCAT	
HEMBRAS						
1	R. 225	0	0	0	0	
2	R. 226	0	0	0	0	
3	R. 227	0	0	0	0	
4	R. 228	0	0	0	0	
5	R. 229	+	0	0	0	
6	R. 230	+	0	0	0	
7	R. 231	0	0	0	0	
8	R. 232	0	+	0	0	
9	R. 233	0	0	0	0	
10	R. 234	0	+	0	0	
MACHOS						
1	R. 235	0	0	0	0	
2	R. 236	+	+	0	0	
3	R. 237	0	0	0	0	
4	R. 238	0	0	+	0	
5	R. 239	0	0	0	0	
6	R. 240	+	+	0	0	
7	R. 241	FALLECIO				
8	R. 242	0	0	0	0	
9	R. 243	+	0	0	0	
10	R. 244	0	+	0	0	

4. Tabla de registro de inflamación 21 días. (PLA, PLA + MSCat, PLA + MSCost, Gelfoam).

		INFLAMACIÓN				
		1 DÍA	SEVERA +++	MODERADA ++	LEVE +	NULO 0
	TERAPIA	PLA	PLA + MSCOST	PLA + MSCAT	GELFOAM	
HEMBRAS						
1	R. 330	+	+	+	+	
2	R. 331	++	++	0	0	
3	R. 332	FALLECIO				
4	R. 333	+	++	+	0	
5	R. 334	+	+	+	0	
6	R. 335	+	+	+	+	
7	R. 336	+	+	+	+	
8	R. 337	+	+	+	+	
9	R. 338	+	+	+	+	
10	R. 339	+	+	+	+	
MACHOS						
1	R. 340	+	+	+	+	
2	R. 341	+	+	+	+	
3	R. 342	+	0	0	+	
4	R. 343	+	+	+	+	
5	R. 344	0	+	+	0	
6	R. 345	+	0	0	+	
7	R. 346	0	0	0	0	
8	R. 347	FALLECIO				
9	R. 348	+	0	0	+	
10	R. 349	+	0	0	0	
11	R. 350	0	+	+	0	
12	R. 351	0	+	+	0	

		INFLAMACIÓN				
		3 DÍAS	SEVERA +++	MODERADA ++	LEVE +	NULO 0
	TERAPIA	PLA	PLA + MSCOST	PLA + MSCAT	GELFOAM	
HEMBRAS						
1	R. 330	+	0	0	+	
2	R. 331	+	+	+	+	
3	R. 332	FALLECIO				
4	R. 333	+	+	+	+	
5	R. 334	+	+	+	+	
6	R. 335	+	0	0	0	
7	R. 336	0	+	+	+	
8	R. 337	0	+	+	0	
9	R. 338	+	+	0	0	
10	R. 339	+	0	0	+	
MACHOS						
1	R. 340	0	+	+	0	
2	R. 341	+	+	+	++	
3	R. 342	0	0	0	0	
4	R. 343	0	0	0	0	
5	R. 344	+	+	0	+	
6	R. 345	0	0	+	0	
7	R. 346	FALLECIO				
8	R. 347	0	0	+	+	
9	R. 348	0	0	0	0	
10	R. 349	0	0	0	0	
11	R. 350	0	+	0	0	
12	R. 351	0	0	0	0	

		INFLAMACIÓN				
		5 DÍAS	SEVERA +++	MODERADA ++	LEVE +	NULO 0
	TERAPIA	PLA	PLA + MSCOST	PLA + MSCAT	GELFOAM	
HEMBRAS						
1	R. 330	0	0	0	0	
2	R. 331	+	+	0	0	
3	R. 332	FALLECIO				
4	R. 333	0	0	+	+	
5	R. 334	0	0	+	+	
6	R. 335	+	0	+	+	
7	R. 336	+	0	+	+	
8	R. 337	0	+	0	0	
9	R. 338	0	0	0	0	
10	R. 339	+	0	0	0	
MACHOS						
1	R. 340	+	+	+	+	
2	R. 341	+	+	+	0	
3	R. 342	+	0	+	0	
4	R. 343	0	0	0	+	
5	R. 344	+	0	0	+	
6	R. 345	+	0	+	+	
7	R. 346	FALLECIO				
8	R. 347	+	0	+	0	
9	R. 348	+	0	0	0	
10	R. 349	+	0	0	0	
11	R. 350	+	0	0	0	
12	R. 351	+	0	0	0	

		INFLAMACIÓN				
		7 DÍAS	SEVERA +++	MODERADA ++	LEVE +	NULO 0
	TERAPIA	PLA	PLA + MSCOST	PLA + MSCAT	GELFOAM	
HEMBRAS						
1	R. 330	0	0	0	0	
2	R. 331	0	+	0	0	
3	R. 332	FALLECIO				
4	R. 333	0	0	0	0	
5	R. 334	0	0	0	0	
6	R. 335	0	0	+	0	
7	R. 336	0	0	+	0	
8	R. 337	0	0	0	0	
9	R. 338	0	0	0	0	
10	R. 339	+	0	0	0	
MACHOS						
1	R. 340	0	0	0	+	
2	R. 341	+	0	+	0	
3	R. 342	+	0	+	0	
4	R. 343	0	0	0	0	
5	R. 344	0	0	0	0	
6	R. 345	0	0	+	0	
7	R. 346	FALLECIO				
8	R. 347	0	0	+	0	
9	R. 348	+	0	0	0	
10	R. 349	0	0	0	0	
11	R. 350	0	0	0	0	
12	R. 351	0	0	0	0	

5. Cartel XL Congreso Mexicano y VII Iberoamericano de Histología 2020.



BIOCOMPATIBILIDAD DE UN CONSTRUCTO TRIDIMENSIONAL DE PLA PARA SU USO EN INGENIERIA DE TEJIDOS.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
Carrera de Cirujano Dentista

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN CÉLULAS TRONCALES E INGENIERÍA DE TEJIDOS. (GICTIT)

Arreola Esquivel Itzel¹, Garrido, Fariña German I.², Mercado Márquez Crisóforo³, Álvarez Pérez Marco A.⁴, Gómez Clavel José F.⁵, Trejo Iriarte Cynthia G.^{*1}

¹ Grupo de Investigación en Células Troncales e Ingeniería de Tejidos (GICTIT), Laboratorio de Investigación en Odontología Almaraz, FES-Iztacala, UNAM ² Laboratorio de apoyo a Histología y Biología, FES-Cuautitlán, UNAM ³ Unidad de Aislamiento y Bacterio, FES-Cuautitlán, UNAM ⁴ Facultad de Odontología, División de Estudios de Posgrado e Investigación, UNAM ⁵ Carrera de Cirujano Dentista, Laboratorio de Investigación y Educación en Odontología, FES-Iztacala, UNAM.



INTRODUCCIÓN:

La Ingeniería de Tejidos (IT) ha demostrado ser una alternativa para el trasplante de órganos, con historias exitosas en implantes. La IT requieren de tres herramientas básicas: las células, un andamio y las moléculas de señalización. El uso de los biomateriales como andamios deben de proporcionar a las células que serán las reclutadoras de nuevas células para la regeneración en un medio ambiente adecuado para su proliferación, migración y diferenciación, y las moléculas señalizadoras son las que promover el microambiente adecuado para la regeneración.



OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la biocompatibilidad y la capacidad de generación de hueso ectópico de un constructo tridimensional de PLA sembrado con MSCat diferenciadas al linaje osteogénico.

METODOLOGÍA:

Se emplearon 80 ratas Wistar (peso 200+/-50g) de ambos sexos, a las que se les realizó una incisión en la epidermis en forma de "sobre" donde se implantaron los constructos. Grupos: PLA, PLA + MSCat, PLA + MSCost, y control con Gelfoam. Los tiempo de estudio fueron: 21 y 60 días, una vez obtenidas las muestras se procesaron histológicamente y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E). Este estudio fue aprobado por la comisión de ética folio: CE/FESI/112019/1333 y bioseguridad de Iztacala folio: 0105.

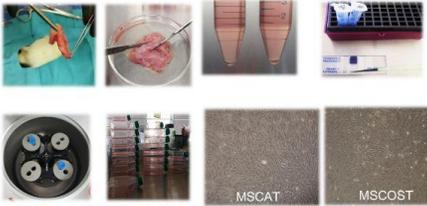


FIGURA 2) OBTENCIÓN DE MUESTRA DE TEJIDO ADIPOSO

FIGURA 3) CONTEO CELULAR PARA DIFERENCIACIÓN A LINAJE OSTEOGÉNICO (MSCost)

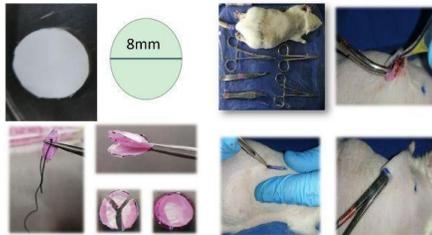


FIGURA 4) PREPARACIÓN DE CONSTRUCTOS TRI-CAPA (PLA)

FIGURA 5) IMPLANTE SUBCUTÁNEO DE CONSTRUCTOS (GELFOAM, PLA, PLA + MSCAT, PLA + MSCOST)

RESULTADOS:

Se realizó un control de inflamación donde no se observó inflamación severa ni rechazo del biomaterial. En los resultados histológicos observamos:

Gelfoam a los 21 días se observó degradación del 60%, no se observaron células inflamatorias ni cápsula alrededor del biomaterial. A los 60 días se absorbió por completo.

PLA a los 21 días se integró sin cápsula de tejido conectivo, se observaron células a su alrededor tipo fibroblasto y no se degradó, se observan las tres capas. A los 60 días las células del tejido conectivo han invadido el biomaterial en sus tres capas y ya no se observan definidas.

PLA+MSCat a los 21 días se integró al tejido, sin cápsula, con células entre las tres capas, no hay degradación. A los 60 días se degradó un 30%, desde el centro hacia afuera y se observan células dentro y alrededor del constructo

PLA+MSCost a los 21 días se intuyen las capas y entre cada capa hay tejido conectivo denso con fibroblastos, degradación 20%. A los 60 días, las tres capas están integradas al tejido, hay gran cantidad de células en todo el biomaterial y las capas ya no son visibles.

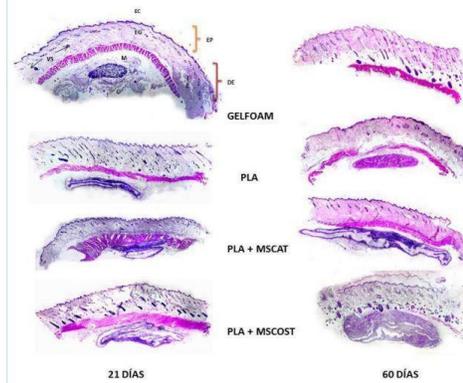


FIGURA 6) IMÁGENES MICROSCÓPICAS A 6X TEÑIDAS CON H&E 21 Y 60 DÍAS. EP (Epidermis), DE (Dermis), EC (Estrato Corneo), EG (Estrato Granuloso), VS (Vaso Sanguíneo), M (Musculo), TC (Tejido Conectivo)

CONCLUSIÓN:

El constructo demostró ser biocompatible, se integró al tejido y la degradación es controlada, mostrándose como osteoconductor.

6. Constancia de participación XL Congreso Mexicano y VII Iberoamericano de Histología 2020.



XL CONGRESO MEXICANO DE HISTOLOGÍA
VII CONGRESO IBEROAMERICANO DE HISTOLOGÍA



MORELIA MICHOACÁN
NOVIEMBRE 2020

La Sociedad Mexicana de Histología A.C.

Otorga la presente constancia a:

Arreola Esquivel Itzel, Garrido Fariña German I., Mercado Márquez Crisóforo, Álvarez Pérez Marco A., Gómez Clavel José F., Trejo Iriarte Cynthia G.

Por haber participado con el trabajo

BIOCOMPATIBILIDAD DE UN CONSTRUCTO TRIDIMENSIONAL DE PLA PARA SU USO EN INGENIERÍA DE TEJIDOS.

XL Congreso Mexicano y VII Iberoamericano de Histología

09-13 noviembre 2020
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, a 13 de noviembre de 2020



Folio: 202.000051

Dr. Germán Isauro Garrido Fariña
Presidente de la Sociedad Mexicana de Histología, A.C.

Mtro. Jorge Alfredo Cuellar Ordaz
Director de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
UNAM



7. Participación con video de difusión en el XXXIX coloquio de investigación de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala 2021.



ID 3040

PLA, COMO ANDAMIO DE UN CONSTRUCTO CON CÉLULAS MESENCIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO, UN ESTUDIO DE BIOCOMPATIBILIDAD.

AUTORES:

Garrido Fariña Germán Isaura
Gómez Clavel José Francisco
Álvarez Pérez Marco Antonio
Trejo Iriarte Cynthia Georgina

Objetivos: Evaluar la biocompatibilidad de un constructo tridimensional de PLA sembrado con MSCat.

Metodología: Utilizamos 80 ratas cepa Wistar, ambos sexos (peso 200+-50g), a las que se les realizó una incisión en el dorso, ahí se implantaron los constructos: PLA (der inf), PLA+MSCat (izq sup), PLA+MSCost (der sup), Gelfoam (izq inf). Tiempos de estudio: 21 y 60 días. Las muestras se procesaron histológicamente y se tiñó con Hematoxilina y Eosina (H&E). Avalado por las comisiones de ética (CE/FESI/112019) y bioseguridad de Iztacala (FESI/1333).

Resultados: En todos los especímenes no se observó rechazo del biomaterial o inflamación severa.

Gealfoam 21 días se observó degradación 60%, no se observaron células inflamatorias ni cápsula alrededor del biomaterial. A 60 días se absorbió por completo.

PLA 21 días se integró sin cápsula de tejido conectivo, se observaron células a su alrededor y no se degradó, se observan las tres capas. A 60 días las células del tejido conectivo invadieron el biomaterial en sus tres capas y ya no se observan definidas.

PLA+MSCat 21 días se integró al tejido, sin cápsula, con células entre las tres capas, no hay degradación. A 60 días se degradó 30%, desde el centro hacia afuera y se observan células dentro y alrededor del constructo

PLA+MSCost 21 días se intuyen las capas y entre cada capa, hay tejido conectivo denso, degradación 20%. A 60 días, las tres capas están integradas al tejido, hay gran cantidad de células en todo el biomaterial y las capas ya no son visibles.

Conclusión: El constructo demostró ser biocompatible, se integró al tejido y la degradación es controlada, mostrándose como una potencial herramienta para su uso en la Ingeniería de Tejidos.



8. Constancia de participación en el II Congreso Nacional de Biomateriales de la Universidad de Antioquia 2021.



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

Personería jurídica ley 71 de 1878 del estado soberano de Antioquia y ley 153 de 1887

En atención a que

ITZEL ARREOLA ESQUIVEL

Identificado con Pasaporte G31093242

Cumplió con las actividades programadas con una intensidad de 16 horas, y reunió los demás requisitos que exigen las normas universitarias en el marco del:

II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

La Facultad de Ingeniería expide la siguiente constancia el 25 de noviembre de 2021.

II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES

Facultad de Ingeniería

Para verificar la autenticidad del documento, dirijase a www.udea.edu.co/wps/portal/udea/web/inicio/pagos e ingrese el código 12901-186795, o escanee el código QR.





**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

Facultad de Ingeniería

Medellín, 11 de Marzo de 2022

21340003-0101-2022

**EL JEFE DEL CENTRO DE EXTENSIÓN
INFORMA QUE:**

El señor **ITZEL ARREOLA ESQUIVEL**, identificado con Pasaporte No G31093242 participó como Ponente invitado al **II CONGRESO NACIONAL DE BIOMATERIALES**, realizado entre los días 24 y 25 de noviembre de 2021

Se expide a solicitud del interesado a los Once (11) días del mes de febrero de 2022.

Atentamente,

MAURICIO ANDRÉS CORREA OCHOA
Jefe Centro de Extensión Académica CESET
Facultad de Ingeniería 
Universidad de Antioquia.

Elaboró: Juan David Velásquez

CESET- CENTRO DE EXTENSIÓN ACADÉMICA
Ciudad Universitaria Calle 67 N.º 53-108, bloque 21, oficina 136
Recepción correspondencia Calle 70 N° 52-21 • Apartado 1226
Teléfono 219 55 15 • Fax 2638282 • NIT 890.980.040-8
<http://ingenieria.udea.edu.co> • Medellín, Colombia



SC-CER745845