



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TESIS

**FORMULACION Y CARACTERIZACION DE UN BIOMATERIAL A  
BASE DE PLA CARGADO CON CARBONATO DE CALCIO  
MEDIANTE LA TECNICA SPRAY-DRYER**

PRESENTA

**ILEANA BUENDIA MELCHOR**

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., MÉXICO, MARZO DE 2020



Formulación y caracterización de un biomaterial a base de PLA cargado con carbonato de calcio mediante la técnica Spray-Dryer by Ileana Buendía Melchor is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TESIS

**FORMULACION Y CARACTERIZACION DE UN BIOMATERIAL A  
BASE DE PLA CARGADO CON CARBONATO DE CALCIO  
MEDIANTE LA TECNICA SPRAY-DRYER**

PRESENTA

**ILEANA BUENDIA MELCHOR**

DIRECTOR DE TESIS

**DRA. MARIA DEL SOCORRO RUIZ RODRIGUEZ**

CODIRECTOR

**DR. BERNARDINO ISAAC CERDA CRISTERNA**

**DR. JAIRO MARIEL CARDENAS**

ASESORES

**DRA. DIANA M. ESCOBAR GARCIA**

**DR. AMAURY POZOS GUILLEN**

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., MÉXICO, MARZO DE 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TESIS

**FORMULACION Y CARACTERIZACION DE UN BIOMATERIAL A  
BASE DE PLA CARGADO CON CARBONATO DE CALCIO  
MEDIANTE LA TECNICA SPRAY-DRYER**

PRESENTA

**ILEANA BUENDIA MELCHOR**

AUTORIDADES:

---

**E.C.M. Ricardo Martínez Rider**  
Director de la Facultad

---

**Dra. Yolanda Hernández Molinar**  
Secretaria de Investigación y  
Posgrado de la Facultad

---

**M.C. María del Socorro Ruiz Rodríguez**  
Coordinador de la MAESTRÍA EN  
CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

San Luis Potosí, S. L. P., México, Marzo de 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TESIS

**FORMULACION Y CARACTERIZACION DE UN BIOMATERIAL A  
BASE DE PLA CARGADO CON CARBONATO DE CALCIO  
MEDIANTE LA TECNICA SPRAY-DRYER**

PRESENTA

**ILEANA BUENDIA MELCHOR**

**Firmas**

**Director de Tesis**

Dra. María del Socorro Ruiz Rodríguez

---

**Codirectores:**

Dr. Bernardino Isaac Cerda Cristerna

---

Dr. Jairo Mariel Cárdenas

---

**Asesores:**

Dr. Diana M. Escobar García

---

Dr. Amaury Pozos Guillen

---

San Luis Potosí, S. L. P., México, Marzo de 2020

## **DEDICATORIA**

A mis padres por haberme apoyado incondicionalmente a lograr esta meta.

A el Dr. Manuel López Quintero por ser mi motivación y apoyo para superarme.

A el Dr. Bernardino I. Cerda Cristerna por ser mi guía en investigación y por todo el apoyo que me brindo durante mi estancia en la maestría.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por permitirme llegar hasta al día de hoy, gracias por guiar mis pasos y poner los medios y a las personas adecuadas, gracias señor por acompañarme a lo largo de mi vida y regalarme la alegría de ver realizado uno de mis sueños. A mis padres por ser el pilar en esta aventura de realizar mi Maestría en Ciencias Odontológicas, Odontología Integral Avanzada, por ser mi apoyo y estar siempre disponibles para lograr mi meta. A mi hermano y mi familia por brindarme siempre su apoyo firme e incondicional para lograr mis objetivos y metas y compartir conmigo mis experiencias.

A mi directora Dra. María del Socorro Ruíz Rodríguez por el apoyo que me brindo durante el desarrollo del trabajo.

A mi codirector Dr. Bernardino Isaac Cerda Cristerna por su apoyo y guiarme en el desempeño de este trabajo.

## RESUMEN

Se han realizado numerosos estudios utilizando el PLA, el cual es uno de los polímeros más utilizados en la ingeniería tisular por sus excelentes características de biocompatibilidad y biodegradabilidad. **Objetivos:** Formular y caracterizar un biomaterial a base de Acido Poli láctico (PLA) cargado con Carbonato de Calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) mediante la técnica Spray-Dryer. **Materiales y métodos:** Para este trabajo se realizaron tres andamios: 1) PLA puro, 2) PLA+  $\text{CaCO}_3$  .250 mg. 3) PLA+  $\text{CaCO}_3$  .500 mg, se realizaron pruebas de biocompatibilidad *in vitro*: viabilidad celular, proliferación celular con osteoblastos, pruebas de hemocompatibilidad. **Resultados:** Al caracterizar el andamio se observa una especie de red de fibras o hilos con micropartículas, así mismo se observó la viabilidad celular de los osteoblastos y un aumento de la proliferación celular en el andamio de  $\text{CaCO}_3$ . La evaluación del efecto de los andamios en los tiempos de protrombina y tromboplastina no fueron afectados. **Conclusiones:** Este estudio presenta una técnica novedosa en la formulación de un biomaterial a base de PLA cargado con  $\text{CaCO}_3$  mediante la técnica spray-dryer. Es un andamio tridimensional que presenta un doble sistema, de acuerdo a su caracterización se observa la presencia de hilos o fibras y micropartículas que potencializan la proliferación celular. Además de no interferir negativamente en el proceso de coagulación sanguínea debido al pH estable que presenta y la presencia del  $\text{CaCO}_3$ .



## ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
RESUMEN .....	1
ÍNDICE .....	2
INDICE DE FIGURAS .....	3
INDICE DE TABLAS.....	4
ANTECEDENTES .....	5
ANDAMIOS .....	16
JUSTIFICACION .....	20
HIPÓTESIS .....	21
METODOLOGÍA.....	23
CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	32
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN .....	46
LIMITACIONES .....	49
CONCLUSIONES.....	50
BIBLIOGRAFIA .....	51
ANEXO 1.....	53

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura química PLA.....	8
Figura 2 Técnica de síntesis Spray-dryer.....	12
Figura 3 Estructura química CACO3.....	13
Figura 4 Algodón.....	25
Figura 5 Grupos de cada andamio en plasma.....	29
Figura 6 Andamio no induce hemolisis.....	30
Figura 7 Cubeta con plasma.....	30
Figura 8 BioBas 10 para determinar PT Y ATTP.....	30
Figura 9 . Fotografías tomadas con microscopio electrónico de barrido (MEB).....	36
Figura 10 Fotografías tomadas de degradación de los andamios.....	37
Figura 11 Viabilidad celular osteoblastos.....	40

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición CaCO <sub>3</sub> . .....	13
Tabla 2 Degradación Andamios. ....	38
Tabla 3 Datos descriptivos de los grupos de estudio en proliferación celular. ....	42
Tabla 4 Comparaciones entre grupos de estudio de proliferación celular. ....	43
Tabla 5 Datos Descriptivos PT Y ATTP.....	44
Tabla 6 Comparación entre grupos.....	45

## ANTECEDENTES

La extracción dental se indica cuando el diente ya no se encuentra en condiciones de ser rehabilitado o mantenerse en boca para la salud o función a largo plazo. La pérdida de un diente tiene un impacto en la calidad de vida de una persona, para la masticación y el habla del paciente, así como en el ámbito social. De la misma manera la ausencia de un diente en su alveolo desencadena una cascada de eventos biológicos que principalmente resultan en cambios anatómicos locales.(1)

Después de la extracción de los dientes, el proceso alveolar sufre atrofia e inicia el crecimiento de hueso en el alveolo, así mismo se da una reabsorción de las crestas alveolares. La mayor cantidad de pérdida ósea se encuentra en la dimensión horizontal y se produce principalmente en el aspecto bucal de la cresta. Además, se da una pérdida de la altura de la cresta vertical, que se ha descrito como más pronunciada en el aspecto bucal. Este proceso de resorción da como resultado una cresta más estrecha y más corta.(1,2)

La pérdida de un diente deja un defecto que puede complicarse por una pérdida ósea previa debido a una enfermedad periodontal, lesiones endodónticas o un traumatismo. Cuando el alvéolo ha perdido paredes o altura se ve más comprometido. El tamaño de la cresta residual se reduce más rápidamente en los primeros 6 meses, pero la actividad de reabsorción ósea en la cresta residual continúa a lo largo de la vida a una velocidad más lenta.(2) Además, durante la extracción del diente, se realizan ciertos movimientos que pueden dañar las crestas óseas y también puede ocasionar la pérdida ósea. (1)

En la última década, a medida que la estética ha recibido más énfasis en la planificación del tratamiento, la reabsorción alveolar después de la extracción dental, se ha convertido en un problema importante, especialmente en la región anterior. (3) Después de la extracción del diente, es un desafío crear una restauración protésica que combine con la dentición natural adyacente. Suficiente volumen óseo alveolar y una arquitectura favorable de la cresta alveolar son esenciales para obtener reconstrucciones protésicas ópticas y funcionales óptimas. Por lo cual, para la planificación del tratamiento, es esencial el conocimiento sobre el proceso de

cicatrización en los sitios de extracción, incluidos los cambios de contorno causados por la resorción ósea.

La idea de "rellenar" el espacio dejado por el diente extraído con un biomaterial emularía un "efecto de retención de raíces" que favorece la preservación ósea. En las últimas 2 décadas, se han realizado estudios que evalúan la eficacia de diferentes enfoques de relleno de alveolos. En los cuales, se ha empleado una gran cantidad de biomateriales, que incluyen hueso autólogo, sustitutos óseos (aloinjertos, xenoinjertos y aloplastos), productos derivados de sangre autóloga y agentes bioactivos, entre otros.

La elevación del colgajo, el uso de una membrana y la aplicación de un injerto, xenoinjerto o un aloinjerto pueden contribuir a mejorar los resultados, especialmente en la preservación de la altura mesiobucal y mesiolingual. Sin embargo, hay un cierto grado de pérdida de volumen de la cresta que debe esperarse. Por lo tanto, es importante y necesaria la investigación para el desarrollo de biomateriales para relleno óseo.

### *Biomateriales para relleno óseo*

Los materiales utilizados para relleno óseo se clasifican de acuerdo con su origen como: a) aloinjertos, b) xenoinjertos, c) aloplásticos.

Los aloinjertos son un tipo de material óseo que se obtiene de un individuo de la misma especie, y frecuentemente son de un cadáver. Un aloinjerto actúa a través de la osteoinducción y también tienen capacidades osteoconductoras en células mesenquimales nativas no diferenciadas. (4–6) El xenoinjerto es un material de origen equino, porcino o bovino que se obtiene mediante la desproteinización. Los componentes orgánicos de estos materiales se eliminan para reducir la reactividad inmune o la transmisión de patógenos y los minerales restantes actúan como un andamiaje para el crecimiento óseo nativo. También se pueden usar en combinación con factores de crecimiento o aloinjertos para simular el hueso autógeno. La formación ósea se produce principalmente a través de la osteoconducción. (4–7)

Los materiales aloplásticos son totalmente sintéticos y se obtienen a partir de fuentes no orgánicas. Los tipos más frecuente de aloplásticos son las cerámicas bioactivas, como los fosfatos de calcio, los cuales se pueden mezclar con factores de crecimiento para aumentar la densidad mineral ósea y la proliferación de osteoblastos. El tipo de efecto de los cerámicos es la osteoconducción; pues actúa como un andamio tridimensional que soporta el crecimiento celular, incrementando la adhesión, proliferación celular y formación de hueso. (4,8)

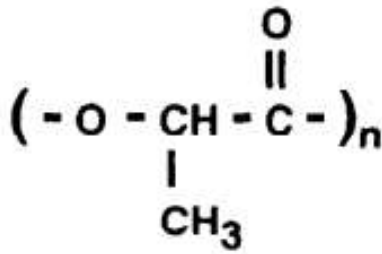
El tamaño de las partículas y la porosidad influyen en las tasas de reabsorción de estos materiales junto con otras propiedades físicas. Las partículas más grandes tienen mayor capacidad de permanecer en el sitio de aumento. Al presentar mayor porosidad tiene velocidades de reabsorción más rápidas que los osteoclastos y puede penetrar en el injerto más fácilmente que el material denso. Algunas cerámicas también pueden disolverse a través de la matriz extracelular. Los materiales aloplásticos pueden incluirse dentro de una matriz polimérica, para facilitar su aplicación en un el tejido óseo, también para que el material aloplástico en conjunto con la matriz, formen una estructura tridimensional que favorezca la adhesión celular y la formación de matriz mineral. El ácido poli láctico es un polímero de origen natural que se usa en ese tipo de combinaciones.

### *Acido poli láctico (PLA)*

Los polímeros a base de ácido poliláctico o poliláctidos (PLA) son polímeros de base biológica que se encuentran disponibles comercialmente y son utilizados en una variedad de aplicaciones debido a su alta resistencia, módulo y biodegradabilidad. (9,10) El PLA es un polímero termoplástico perteneciente a la familia  $\alpha$ -hidroxiácido y se obtiene como producto de la fermentación del almidón de plantas como el maíz, la caña de azúcar, las papas y la remolacha. El polímero se sintetiza por policondensación directa de ácido láctico o polimerización por apertura de anillo de dímero de lactida utilizando un catalizador adecuado. La lactida es producida a gran escala y es de base biológica, biocompatible y biodegradable. (9–11)

Se han reportado procesos enzimáticos sintéticos que utilizan lipasas para la producción de PLA, eliminando el uso de catalizadores metálicos. Sin embargo, dichos procesos ecológicos se encuentran en su etapa inicial, así que la producción principal de PLA aún se basa en las técnicas de condensación tradicionales, porque el PLA contiene dos estereoisómeros de ácido láctico, y se puede sintetizar como PLLA, PDLA o PDLLA. Los dos homopolímeros enantioméricamente puros (PLLA y PDLA) y una serie de polímeros racémicos de PDLLA con proporciones variables de los monómeros presentan una gama de propiedades físicas. Además, las propiedades térmicas y mecánicas del PLA varían con el peso molecular. (9) (Figura 1)

### **Poly (lactic acid)**



*Figura 1 Estructura química PLA.*

Las propiedades de tracción superiores de PLA lo convierten en un candidato ideal para aplicaciones de carga. No obstante, la baja tenacidad al impacto tiene un efecto de impedimento sobre su facilidad de uso en aplicaciones mecánicamente intensas, como implantes e injertos óseos. Además, por el alto nivel de hidrofobicidad de PLA podría suponerse que es un polímero inadecuado para su uso en sistemas biológicos. Pero debe considerarse que, cuando el PLA se combina con un biomaterial, la hidrofobicidad puede reducir. Las propiedades útiles de PLA superan las limitaciones, que pueden eliminarse o enmascararse mediante una variedad de técnicas de modificación masiva, incluida la mezcla de polímeros. Por ejemplo, la mezcla de PLA con polímeros con mayor humectabilidad puede mejorar la hidrofobicidad de PLA en la mezcla. (9)

Los polímeros sintéticos como el PLA a menudo se mezclan con polímeros naturales para generar materiales híbridos con propiedades termomecánicas óptimas para su

procesamiento y uso en aplicaciones en biomedicina. Algunos polímeros naturales como el quitosán, el colágeno, la elastina y el ácido hialurónico son preferidos para aplicaciones biomédicas como la ingeniería de tejidos, ya que simulan los materiales nativos encontrados en los sistemas biológico. Aunque presentan pobres propiedades mecánicas, estas limitan su uso en entornos mecánicamente exigentes. (9)

El primer uso del PLA en aplicaciones médicas fue como una película para liberación lenta de antagonistas narcóticos. Posteriormente su uso biomédico fue también reconocido como una sutura bioabsorbible, desde este descubrimiento aparece como una propuesta para la fabricación de productos con aplicaciones biomédicas, así aparecen andamios, membranas, biosensores, etc.

Dependiendo del objetivo de aplicación, las mezclas de PLA se pueden formar en una variedad de estructuras, que incluyen películas, membranas, andamios porosos, fibras, partículas e hidrogeles y por ser un método físico, no altera la huella química de los componentes.

Las mezclas proporcionan los medios por los cuales se pueden generar las propiedades requeridas para el producto final que puede ser mezclando dos polímeros preexistentes, a menudo se adaptan de acuerdo con las especificaciones para las aplicaciones del producto.

A pesar de ser un material con alta resistencia y módulo de elasticidad, el PLA carece de aplicación en entornos mecánicamente exigentes debido a baja tenacidad al impacto, naturaleza quebradiza y bajo alargamiento en la rotura. Por lo tanto, el PLA a menudo se mezcla con otros polímeros para combinar las propiedades de dos o más polímeros o para mejorar las propiedades termomecánicas del PLA o del otro constituyente. (9) Para lograr un rendimiento óptimo in vivo del producto final se debe mantener la degradación de las mezclas de PLA dentro de las limitaciones fisiológicas, mientras se ajusta el perfil de degradación para biomédicos específicos.

Al realizar un ajuste en la composición de la mezcla no solo altera la velocidad de degradación, sino que también modifica el patrón para permitir que el material se degrade de una manera compleja, lo cual puede ser particularmente beneficioso para diseñar perfiles de liberación para aplicaciones de administración de fármacos y para



compatibilizar la degradación del andamio al tejido en recuperación en ingeniería de tejidos o aplicaciones de injerto.

Las mezclas de PLA con uno o más polímeros o copolímeros pueden producir patrones de degradación muy complejos, por lo que deben de ser adecuadamente evaluados.(12)

Cuando hay mezclas ricas en PLA se da un retraso inicial en la degradación, pero al final logran un mayor grado de degradación. El PLA puro inicia a degradarse después de 20 días y logra hacerlo por completo al final de los 70 días.(13)

Las mezclas de polímeros se pueden preparar mediante dos métodos: 1) mezcla de disolventes que implica la disolución de la mezcla de polímeros en un codisolvente y 2) mezcla por fusión mecánica de la mezcla de polímeros fundidos. En el caso de la mezcla de disolventes, los polímeros se disuelven en un codisolvente y se procesan para formar el producto final, seguido de la evaporación del disolvente.(9)

#### *Técnicas de síntesis de sistemas a base PLA*

Las mezclas de polímeros preparadas por disolución en un solvente se pueden moldear en películas y materiales porosos, hilar (en húmedo, seco o electrospining) y someterlos a técnicas de partículas (por ejemplo, emulsión -difusión-evaporación, separación de fases, secado por aspersion) para formar partículas de perfiles de diferentes tamaños. (9,14)

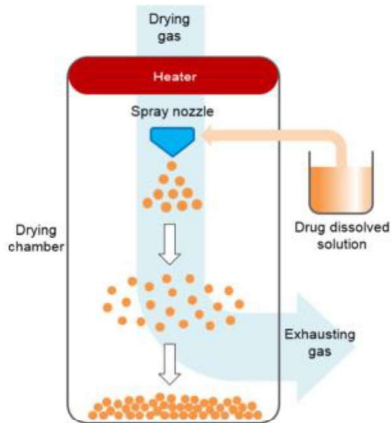
La técnica de evaporación de emulsión-difusión es el método más utilizado para preparar partículas para el suministro de medicamentos y bioactivos, ya que presenta una capacidad de adaptación para encapsular una variedad de materiales con diferentes atributos físico-químicos. A parte de las técnicas de emulsión y difusión, se han explorado técnicas de secado por aspersion para la preparación de partículas de mezclas de PLA. (11)

### *Técnica Spray-dryer*

La primera mención de la aplicación de esta técnica es en el año 1860 y fue patentada en 1872, aunque el verdadero auge de esta tecnología de secado por pulverización (spray—dryer) fue impulsada por la Segunda Guerra Mundial, donde había la necesidad de transportar grandes cantidades de alimentos, despertando la búsqueda de nuevos métodos de reducción de peso y volumen de los alimentos y fue el spray-dryer quien demostró ser la técnica ideal para satisfacer estos requisitos.

El primer alimento en ser transformado a micropartículas fue la leche, convirtiéndola así en polvo.(15) La técnica de secado por aspersion (spray-dryer) consiste en tres fases principales: I) atomización/formación de gotas, II) evaporación del solvente y III) recolección de partículas. Es un método de producción continua de partículas, donde un fármaco se disuelve o dispersa en una fase orgánica con un polímero que luego se pulveriza en forma de gotitas nanométricas o micrométricas en el flujo de aire seco. La fase orgánica se evapora instantáneamente. Así se obtienen micro o nanopartículas. Las partículas secas se recogen a baja presión con un flujo de aire seco.

Esta técnica es fácil de configurar, pero al mismo tiempo, es difícil controlar la distribución del fármaco en las partículas. El secado por aspersion se ha estudiado para la encapsulación de proteínas para mejorar la estabilidad de las biomacromoléculas. Las nanopartículas o micropartículas pueden tener tamaños que varían en un rango de 300 nm a 5  $\mu$ m, siendo excelentes para aplicaciones de administración de fármacos. También es útil para la producción de partículas de fármacos hidrófobos a gran escala. Por ejemplo, se han producido micropartículas de PLA. La distribución de tamaños y la morfología de las micropartículas de PLA secadas por aspersion se han analizado por SEM. Estudios han reportado que, dependiendo de las características de la formulación, el diámetro más grande fue 3  $\mu$ m para obtener el 5% de la solución de PLA y no hubo diferencias significativas entre el 0,5% y el 1% de las soluciones de PLA. (11,16–18)(Fig. 2)



*Figura 2 Técnica de síntesis Spray-dryer.*

Además de la administración de fármacos, las partículas de mezclas de PLA también se usan para fabricar andamios de ingeniería tisular, donde pueden emplearse para sostener la liberación de factores de crecimiento o agentes de diferenciación en un andamio compuesto de otros materiales o pueden formar la estructura física por sí mismos. La porosidad de los materiales es un criterio de diseño importante para ciertas aplicaciones, por ejemplo, andamios para ingeniería de tejidos, sustratos de administración de fármacos y membranas.

Se pueden emplear diferentes métodos para inducir la porosidad en polímeros y mezclas de polímeros, se requiere una estructura porosa para la proliferación óptima de las células y el desarrollo de la microvasculatura. Actualmente, hasta donde sabemos, no se ha explorado el uso de secado por aspersion para producir una matriz de PLA que no sea una micro o nanopartícula. Debido a las posibilidades del sistema de secado por aspersion, es posible usarlo también para crear matrices hiladas que pueden emplearse como relleno. Un estudio piloto hecho por B.I. Cerda-Cristerna y S. Cabo Araoz (datos no publicados), antecede que una matriz de PLA fue formada por secado por aspersion. Pero la matriz no fue caracterizada, por lo que se desconocen las propiedades físico-químicas de la matriz. Por su apariencia hilada, como algodón, la matriz puede ser formulada junto con un osteoconductor como el carbonato de calcio, para posiblemente promover la formación de tejido mineral.

### Carbonato de Calcio ( $\text{CaCO}_3$ )

El carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) es uno de los materiales más abundantes que se encuentran en la corteza terrestre y forma los tipos de roca como la piedra caliza y la tiza y es el componente principal de las conchas de organismos marinos, caracoles, bolas de carbón, perlas y cáscaras de huevo(19).

El carbonato de calcio se encuentra formado por tres elementos principales: carbono, oxígeno y calcio (19).

Tiene un peso molecular de 100.09

La estructura química  $\text{CaCO}_3$ :

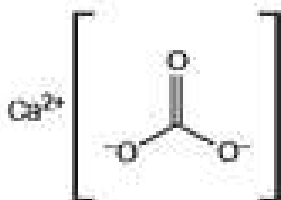


Figura 3 Estructura química  $\text{CaCO}_3$

La composición elemental del  $\text{CaCO}_3$ :

Componente	Formula molecular	%		
		C	Ca	O
Carbonato de Calcio	$\text{CaCO}_3$	12.00	40.04	47.96

Tabla 1 Composición  $\text{CaCO}_3$ .

De acuerdo a la United States Pharmacopeia (USP), el  $\text{CaCO}_3$  se define como un polvo fino, blanco, inoloro, sin sabor y microcristalino, insoluble en agua (19). Es un biomaterial inorgánico que tiene una alta capacidad de amortiguación, que puede neutralizar efectivamente el medio ácido causado por la degradación de los poliláctidos. Se ha preferido su uso debido a la biodegradabilidad, abundancia y menor precio en comparación con biomateriales sintéticos. El carbonato de calcio coralino (calcita) es totalmente reabsorbible y biocompatible y muestra buena osteoconductividad, por lo cual se ha utilizado como un sustituto óseo eficaz en forma natural o convertida en hidroxiapatita en odontología y ortopedia. Además, mejora la reacción celular en relación con el polímero puro, ya que es una fuente de iones de calcio que promueven la regeneración ósea (20,21).

El  $\text{CaCO}_3$  se ha utilizado como un excipiente farmacéutico, se usa principalmente como diluyentes, agentes de recubrimiento y aglutinante húmedo en formas de dosificación sólidas, como base para preparaciones medicinales y dentales, y como adyuvante de disolución y disolución en tabletas dispersables, así como aditivo alimentario. Las micropartículas de carbonato de calcio poroso se han utilizado como portadores de varias moléculas bioactivas, incluidas proteínas y fármacos (22). Dentro de sus usos ha tenido éxito en la regeneración ósea y esto puede ocurrir como carbonato de calcio amorfo (ACC) y como tres polimorfos cristalinos: calcita, aragonita y vaterita (23).

Las micropartículas porosas de  $\text{CaCO}_3$  se pueden fabricar de diferentes tamaños que van de 400 nm a varias micras. El uso de las partículas de  $\text{CaCO}_3$  permite una amplia formación de partículas combinadas. Además, porque el calcio es el principal componente de los huesos, el  $\text{CaCO}_3$  se ha utilizado clínicamente en el tratamiento de enfermedades relacionadas con los huesos. El volumen interno del de poro de  $\text{CaCO}_3$  de las partículas representa hasta el 50% de su volumen total, permitiendo así la interacción de los poros con otras micropartículas. (22,24,25)

Considerando las propiedades del  $\text{CaCO}_3$  así como el potencial de la matriz de PLA en algodón, es de interés explorar la formulación de la matriz junto con  $\text{CaCO}_3$ . El resultado de la mezcla de ambos biomateriales puede resultar en la formación de una matriz de sistema tridimensional que promueva la formación de tejido mineral *in vivo*. Antes de suponer una evaluación *in vivo*, es necesario formular y caracterizar el sistema. Hasta ahora, no se conocen reportes sobre una matriz hilada y formulada con secado por aspersion y que además esté cargada con  $\text{CaCO}_3$ .

## ANDAMIOS

Los andamios son estructuras de soporte de crecimiento celular compuestas por materiales biocompatibles, se trata de matrices de soporte sólido especialmente diseñadas para la conexión de celdas en ingeniería de tejidos y regeneración de tejidos guiados, los cuales deben cumplir con ciertos requisitos como: biocompatibilidad, anti-trombogénesis, perfil de degradación específico de la aplicación y propiedades mecánicas apropiadas para emparejar vasos o tejidos nativos. Debido a su biocompatibilidad el PLA y sus mezclas con otros polímeros se han explorado para desarrollar andamios porosos utilizando diferentes técnicas como electrospinning, lixiviación de partículas y espumación. (9,26)

Los andamios de las mezclas de PLA muestran una endotelización mejorada, la viabilidad celular y una morfología fisiológica de adoquines en las células en comparación con los rellenos convencionales de poly (tetra-fluoroetileno) (9).

Existe infinidad de tipos de andamios, hay informes de PLA mezclado con plastificantes solos para mejorar las propiedades de los polímeros, ya sea para hacerlos más procesables o para mejorar aún más sus propiedades el polietilenglicol y los derivados o copolímeros de PEG son plastificantes comunes que se usan para mezclar con PLA para aumentar la tenacidad y la flexibilidad.

Los andamios en ingeniería de tejidos que utilizan PLA como uno de sus componentes se basan en sus propiedades mecánicas ideales para la integridad estructural y la facilidad de procesamiento. La mezcla de PLA con otros polímeros naturales o sintéticos con mejor humectabilidad y degradación más rápida proporciona un medio viable para ajustar su biodegradabilidad para que sea compatible con el tiempo tomado para el crecimiento y / o recuperación del tejido. Por lo tanto, las mezclas de PLA con diferentes polímeros ofrecen la oportunidad de adaptar andamios específicos de tejido (9,26–28).

### *Biocompatibilidad: viabilidad celular*

La microporosidad de los andamios y su degradabilidad juegan un papel importante en la regeneración ósea. La microporosidad interviene en la degradación y disolución del sustituto al estar en contacto biológico, por lo tanto, una superficie que presenta una mayor porosidad muestra mejor degradabilidad y también se da una mejor absorción de proteínas como son las proteínas morfogenéticas ósea y otras que son necesarias para la formación ósea, pero así mismo la presencia de más porosidades puede influir de manera contraria en la adhesión celular y posteriormente en la proliferación celular. La degradación de estos andamios es esencial para que se inicie el proceso de deposición ósea.(20,29–31) Por lo tanto, la caracterización de un sistema de tipo algodón de PLA y CaCO<sub>3</sub>, es necesaria para entender el comportamiento *in vitro* de las células que entran en contacto con el sistema 3D.

### *Biocompatibilidad: coagulación sanguínea*

Un biomaterial que se formula con la intención de colocarse en lecho quirúrgico debe ser hemocompatible en relación con la coagulación. El material no debe afectar el mecanismo biológico que lleva a la formación del coágulo, pues si lo afecta, entonces retrasará o inhibirá la coagulación, siendo eso algo indeseado. Por eso, es necesario evaluar al biomaterial en su efecto sobre la cascada de la coagulación.

En la coagulación sanguínea se lleva a cabo una serie de reacciones que se generan a nivel celular donde el principal objetivo es la formación de trombina en el sitio de la lesión vascular. En este proceso participan los llamados factores de la coagulación, que son 12 y los primeros cuatro tienen nombres comunes: fibrinógeno, protrombina, factor tisular (TF) y calcio y no se les asigna ningún número romano.(32)

La protrombina es una proteína plasmática formada por el hígado, es una proteína inestable que se divide en proteínas más pequeñas, una de ellas la trombina. La trombina generada a partir de la protrombina también tiene efectos proinflamatorios



que se ejercen mediante la activación de receptores activadores de proteasas que se encuentran en monocitos, linfocitos, endotelio y células dendríticas.(32)

La coagulación se puede dar por tres pasos fundamentales:

1. Como respuesta a la ruptura o a la lesión de un vaso sanguíneo se forman unas sustancias; formando el complejo activador de la protrombina.
2. El activador de la protrombina cataliza la transformación de la protrombina en trombina.
3. La trombina actúa como una enzima para convertir el fibrinógeno en fibras de fibrina, que atrapan plaquetas, eritrocitos y plasma para formar el coágulo.

Cuando inicia la coagulación se forma el activador de la protrombina, el cual se puede producir por dos vías:

1. Vía extrínseca, que comienza con un traumatismo de la pared vascular y de los tejidos circundantes.
2. Vía intrínseca, que se inicia en la propia sangre.

La vía extrínseca se produce de la siguiente manera:

1. Liberación de tromboplastina tisular.

El tejido lesionado libera un complejo de varios factores, llamado tromboplastina tisular; estos factores son fosfolípidos de las membranas de los tejidos dañados y un complejo lipoproteico que actúa como enzima proteolítica.

2. Activación del factor X para formar factor X activado.

El complejo lipoproteico de la tromboplastina tisular se combina con el factor VII de la coagulación y en presencia de los fosfolípidos de los tejidos dañados y de iones calcio, actúa enzimáticamente sobre el factor X para dar factor X activado.

3. Efecto del factor X activado para formar el activador de la protrombina.

El factor X activado se combina inmediatamente con los fosfolípidos tisulares liberados, que forman parte de la tromboplastina tisular y con el factor V para formar el complejo llamado activador de la protrombina. A los pocos segundos, este escinde la protrombina para formar trombina y el proceso de coagulación prosigue como se ha descrito. El factor X activado es la proteasa que realmente produce la ruptura de la protrombina para dar trombina.

Para evaluar el sistema de coagulación utiliza de forma rutinaria el tiempo de protrombina (PT), el tiempo de tromboplastina parcial activado (ATTP) y el tiempo de trombina, así como en algunos casos de añade fibrinógeno.

Para evaluar la vía extrínseca se determina el tiempo de protrombina (PT) que consiste en medir el tiempo de coagulación de un plasma citrado en presencia de tromboplastina (mezcla de factor tisular con fosfolípidos) e iones calcio. Los resultados se pueden expresar en tiempo (segundos), % o en razones.

Para evaluar la vía intrínseca se determina el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) consiste en medir el tiempo de coagulación del plasma citratado en presencia de tromboplastina parcial (la fracción fosfolípídica de la tromboplastina, denominada cefalina), un activador de carga negativa e iones calcio.

Los rangos normales dependen del reactivo y del sistema de detección de coagulo.(32,33)

## JUSTIFICACION

Hasta ahora se encuentran disponibles diferentes materiales de relleno en forma de gránulos, membranas, esponjas, factores de crecimiento, entre otras; todos estos materiales están diseñados con el fin de proporcionar una mejor manipulación o mejor manejo. Se han realizado numerosos estudios utilizando el PLA, el cual es uno de los polímeros más utilizados en la ingeniería tisular por sus excelentes características de biocompatibilidad y biodegradabilidad. Se han desarrollado numerosas mezclas de este material con otros polímeros y con materiales osteoconductores con el fin de aumentar su capacidad mecánica para poder formular un material que además de ser osteoconductor proporcione mejor manipulación. Dentro de las mezclas más comunes se encuentran aquellas a base de fosfato de calcio y carbonato de calcio, debido a que son materiales que se encuentran presentes en el tejido óseo, por lo cual ofrece adecuadas propiedades de bioactividad. En el campo de la biomedicina se han desarrollado un sin número de estudios en los cuales se ha utilizado esta mezcla de PLA con  $\text{CaCO}_3$ , basados principalmente en hidrogeles y han proporcionado resultados excelentes tanto en biocompatibilidad, como en viabilidad celular. Una innovación a la formulación de matrices de PLA es la formulación de la matriz con la técnica de secado por aspersión. Si bien, existen técnicas de formulación de hilado, la formulación con secado por aspersión es rápida y económica, además que permite un buen aprovechamiento del material. Por otro lado, es necesario caracterizar una matriz de PLA hecha con secado por aspersión, puesto que no se conoce evidencia sobre este tipo de matriz. El estudio de ese problema permitirá conocer las propiedades de una matriz de PLA cargada con  $\text{CaCO}_3$ . Es una primera aproximación a conocer sobre ese tipo de matrices tridimensionales.

## HIPÓTESIS

**Alternativa:** La técnica de Spray-Dryer permite la síntesis/creación de un biomaterial a base de PLA cargado con  $\text{CaCO}_3$ .

**Nula:** La técnica de Spray-Dryer no permite la síntesis/creación de un biomaterial a base de PLA cargado con  $\text{CaCO}_3$ .

### **Objetivo General:**

1. Formular y caracterizar un biomaterial a base de Acido Poli láctico (PLA) cargado con Carbonato de Calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) mediante la técnica Spray-Dryer.

### **Objetivos Específicos:**

1. Formular y caracterizar un andamio a base de PLA cargado con  $\text{CaCO}_3$ .
2. Evaluar viabilidad celular y citotoxicidad del biomaterial.
3. Evaluar el efecto del biomaterial en los tiempos de protrombina y tromboplastina.

**Tipo de estudio:**

Experimental *in vitro*

**Variables Dependientes:**

- PLA
- PLA+CaCO<sub>3</sub> .250 mg.
- PLA+CaCO<sub>3</sub> .500 mg.

**Variables Independientes:**

Viabilidad celular, pH, peso, tiempo protrombina, tiempo tromboplastina parcial activada.

## **METODOLOGÍA**

### **FASE I**

Formulación de andamio a base de PLA con  $\text{CaCO}_3$  mediante la técnica de Spray Dryer.

### **FASE II**

Caracterización de andamio a base de PLA con  $\text{CaCO}_3$ .

### **FASE III**

Ensayo de proliferación celular no radiactiva AQueous CellTiter 96®.

Ensayo de Vida/Muerte™.

Evaluación del efecto del biomaterial sobre los tiempos de Protrombina (PT) y Tromboplastina Parcial Activada (APTT) con BioBas 10.

### **FASE IV**

Análisis Estadístico

## **FASE I:**

### **Formulación de andamio de PLA y PLA con CaCO<sub>3</sub> mediante la técnica de Spray Dryer.**

Materiales y métodos:

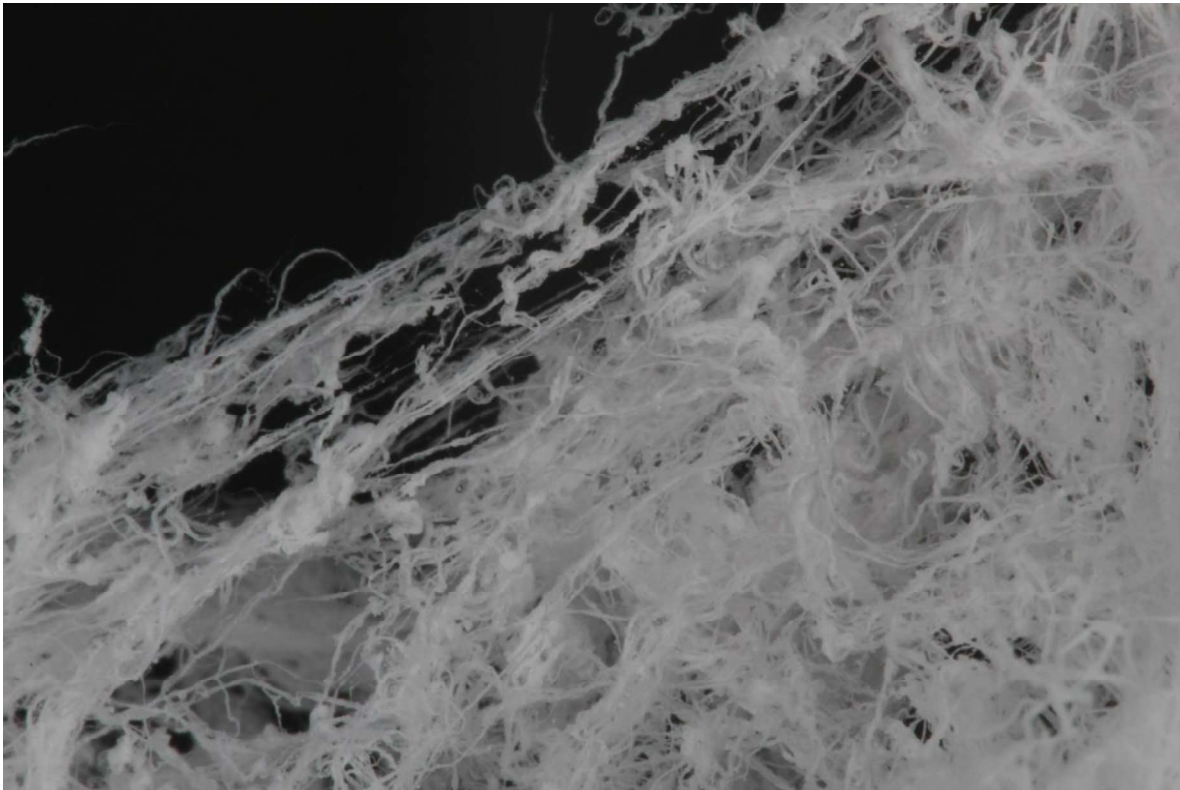
- Acido poli-láctico (PLA); 192,000 (Ingeo Biopolymer 2003D): 5.12 gramos..
- Diclorometano (DCM): 50ml
- Carbonato de calcio, Catálogo, 310034-500G. Lot no. MKBN4408V. 1.04 gramos.
- Agitador magnético
- Vaso de Precipitado 100ml
- Maquina Spray Dryer Mini Spray Dryer B-290 (Büchi) del Laboratorio de Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP.

Se vertieron 50 ml de diclorometano (DCM) en un vaso de precipitado de 100 ml. Posteriormente se agregaron 2.58 gramos de PLA y se colocó en el magnetic sterrier a velocidad 7 para disolver el PLA. La velocidad de la platina se colocó a 1 RPM durante 10 minutos, se incrementó a 8 RPM a partir de 10 minutos, a los 15 minutos, se incrementó la velocidad a 10 RPM. El PLA se disolvió durante 25 minutos. Después se agregaron 0.250 gramos de carbonato de calcio y se redujo la velocidad a 8 RPM y se mantuvo agitando durante 5 minutos. Posteriormente se agitó la suspensión con un agitador magnético a temperatura ambiente a una velocidad de 500 RPM 10 minutos antes de cargar el Spray Dyer manteniendo la agitación de manera constante, obteniendo así un andamio tridimensional. (Fig.1).

Los parámetros técnicos del proceso que permanecen fijos todo el proceso son los siguientes:

- Ajustar la temperatura de parámetro en: 50°C.
- Temperatura de entrada y de salida: 50°C y 39°C
- Flujo de aire de atomización = 600 L/h.
- Aspiración máxima (100%).
- Temperatura de salida = 37-38° C.
- Flujo del líquido de atomización = 40%, palanca totalmente cerrada a la izquierda.
- Nivel del "Nozzle": 5

Se repitió la técnica de Spray-dryer con la concentración de .500 mg de  $\text{CaCO}_3$  y con PLA solo.



*Figura 4 Algodón*



## **FASE II:**

### **Caracterización de andamio de PLA y PLA con CaCO<sub>3</sub>.**

Se observó la morfología estructural del andamio mediante microscopio electrónico de barrido (MEB) JEOL Modelo: JSM-6510 Japonés. Se realizó un baño de oro y posteriormente se observó una muestra de cada andamio (PLA, PLA+CaCO<sub>3</sub> 250 mg y PLA+CaCO<sub>3</sub> 500 mg) a diferentes magnificaciones 100x, 120x,350x,430x y 1000x.

### **Degradación del andamio de PLA y PLA con CaCO<sub>3</sub>.**

Se evaluó la degradación hidrolítica de cada uno de los andamios sumergiendo 25 mg de cada uno en 5 ml de Phosphate-buffered saline (PBS). Las muestras se colocaron en el Incu-Shaker mini a 90 RPM a 37 ° C y se evaluó el peso de cada muestra en intervalos de 0,7,14,21 y 30 días, así como también el pH.

### **FASE III:**

#### **Cultivo de Osteoblastos**

Los osteoblastos empleados pertenecen a una línea celular ATCC (hFOB1.9), que fueron proporcionados por el Laboratorio de Ciencias Básicas de la Facultad de Estomatología de la UASLP. Los osteoblastos se cultivaron en DMEM Low Glucose 5% a 37°C bajo una atmosfera de 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **Ensayo de proliferación celular no radiactiva AQueous CellTiter 96®**

El ensayo de proliferación celular se realizó en todos los andamios. Se colocaron 20 µl de cultivo de osteoblastos y 80 µl de medio al 2% en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas a 37.5 C° a una atmosfera de 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se retiró todo el medio de los pocillos y se reemplazó por 100 µl de eluido de cada tratamiento y se incubaron durante 24 horas. Al final del periodo de incubación se preparó la solución de trabajo de acuerdo al fabricante (The CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, catalog #TB16) se agregaron 20 µl directamente a cada muestra y se incubaron durante 3 horas bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Posteriormente, las muestras se colocaron en un lector de microplacas (Thermo Scientific FC Multiskan®, Vantaa, Finland) a 490 nm.

### **Ensayo de Vida/Muerte™**

Se realizaron eluidos de cada andamio y se refrigeraron a 4°C durante 24 horas. Se incubaron células osteoblastos en una placa de cultivo de 24 pozos durante 24 horas a 37.5°C a una atmosfera de 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se añadieron 500 µl de eluido de cada membrana y se incubaron durante 24 horas a las mismas condiciones antes mencionadas. Al final del periodo de incubación se colocó la solución de vida/muerte a una concentración de 4 µl EthD-1 y 1 µl calceína en 2 ml de PBS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Life Technologies, viability/cytotoxicity kit LIVE/DEAD®, LifeTechnologies, catalog #L-3224) y se incubaron durante 30 minutos a 37.5 C° a una atmosfera de 95% de humedad y 5 % de CO<sub>2</sub> antes de ser evaluados mediante microscopio de escaneo láser confocal (CLSM) (DMI400B, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

### **Evaluación del efecto de los andamios de PLA y PLA con $\text{CaCO}_3$ sobre los tiempos de Protrombina (PT) y Tromboplastina Parcial Activada (APTT) con BioBas 10.**

Se tomaron muestras de sangre de individuos sin antecedentes médicos relevantes que participaron de manera voluntaria y consentida (Anexo 1); la toma de muestras se llevó a cabo en el laboratorio de fisiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Veracruzana Campus Rio Blanco, Veracruz, México.

Se depositaron 10 mg de cada muestra del andamio en un tubo tipo Corning de 15 ml, se realizaron 3 experimentos: tiempo de PT, tiempo de APTT y ensayo de hemólisis. Cada tubo se etiquetó de acuerdo al andamio que correspondía, posteriormente se colocaron 250  $\mu\text{l}$  de sangre en cada tubo. Se dejaron incubar durante 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y agitación oscilatoria a 50 RPM, y después se centrifugaron 5 minutos a 3000 RPM, para evaluar si inducía hemólisis, lo cual no sucedió.

Se evaluó primero el PT y posteriormente el APTT.

Se colocaron las muestras en una gradilla y se incubaron en agitación rotacional por 15 minutos a 50 RPM. El BioBas10 se calentó a  $37^\circ\text{C}$ . Se colocaron los mini-tubos en la centrífuga durante 5 minutos a 300 RPM para separar el plasma del contenido hemático. Posteriormente los tubos se colocaron en una cubeta cada muestra colocando el reactivo PT/APTT en el BioBas de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Determinación del Tiempo de Protrombina (PT), y Determinación cuantitativa del Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT) catalog # COIS11-E SPINREACT, S.A./S.A.U..)



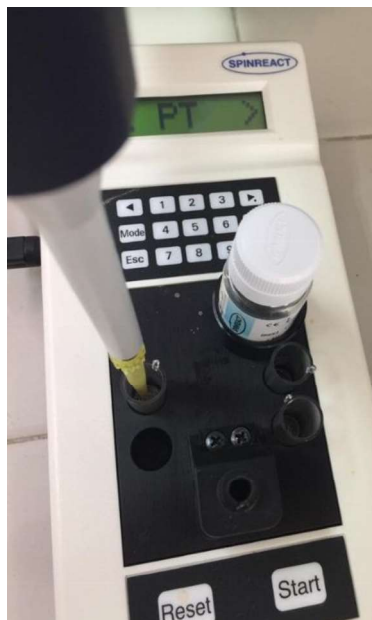
*Figura 5 Grupos de cada andamio en plasma.*



*Figura 6 Andamio no induce hemolisis*



*Figura 7 Cubeta con plasma.*



*Figura 8 BioBas 10 para determinar PT Y APTT.*

## **FASE IV:**

### **Análisis Estadístico**

Se utilizó el software MINITAB versión 19. Se determinó la estadística descriptiva que incluía a las variables continuas resumidas como medias, y desviación estándar y a las variables categóricas como conteos y porcentajes. El análisis de datos cuantitativos fue evaluado mediante Shapiro-Wilks para determinar la normalidad de los datos. Los datos del ensayo de proliferación celular, se analizaron mediante la prueba t-student.

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

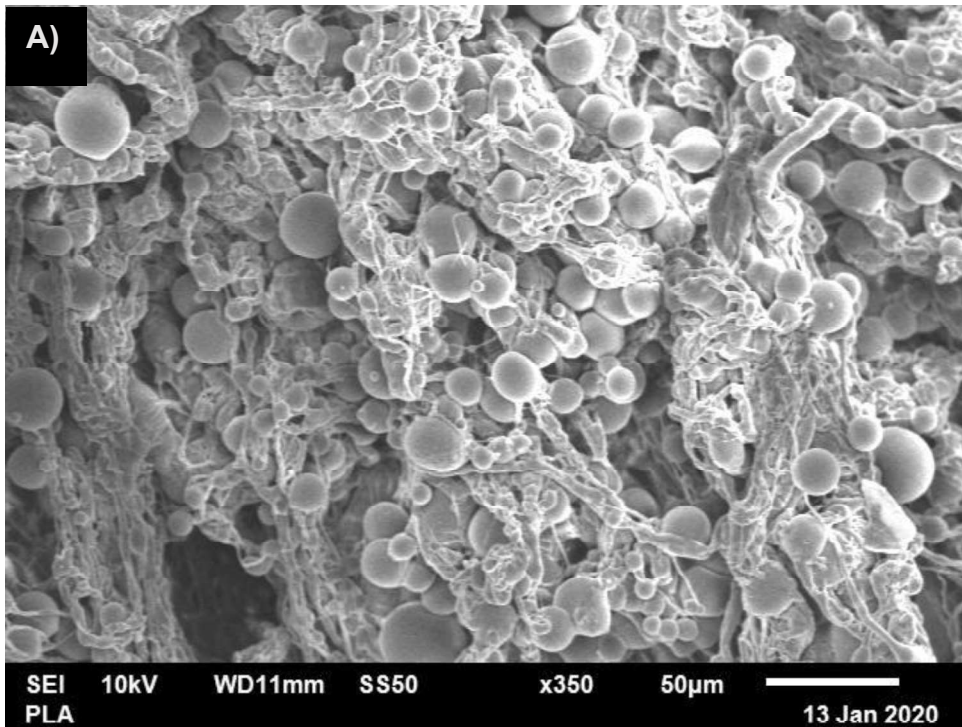
Los osteoblastos empleados son de una línea celular ATCC Osteoblastos (hFOB1.9) proporcionados por el laboratorio de ciencias básicas de la Facultad de Estomatología de la UASLP. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas de individuos sin antecedentes médicos relevantes que participarán de manera voluntaria y consentida. Ninguno de los procedimientos previamente mencionados puso en riesgo a los individuos.

Todos los desechos biológicos se manipularon de acuerdo a las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Protección ambiental- salud ambiental-Residuos peligrosos biológicos infecciosos y bajo la supervisión de los responsables del protocolo. (Anexo 1)

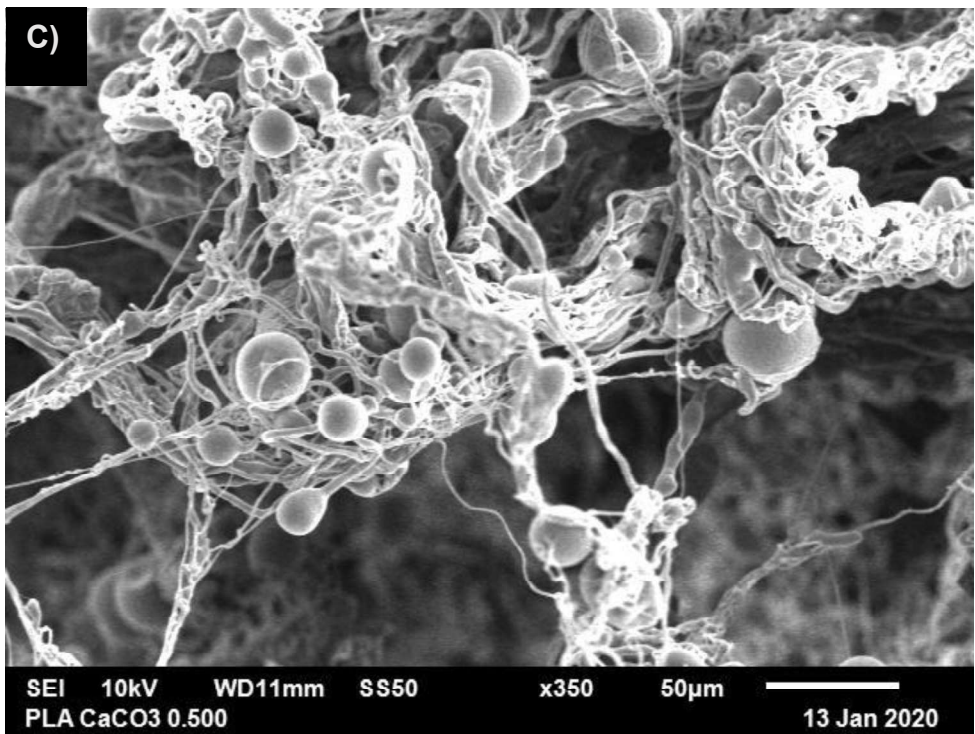
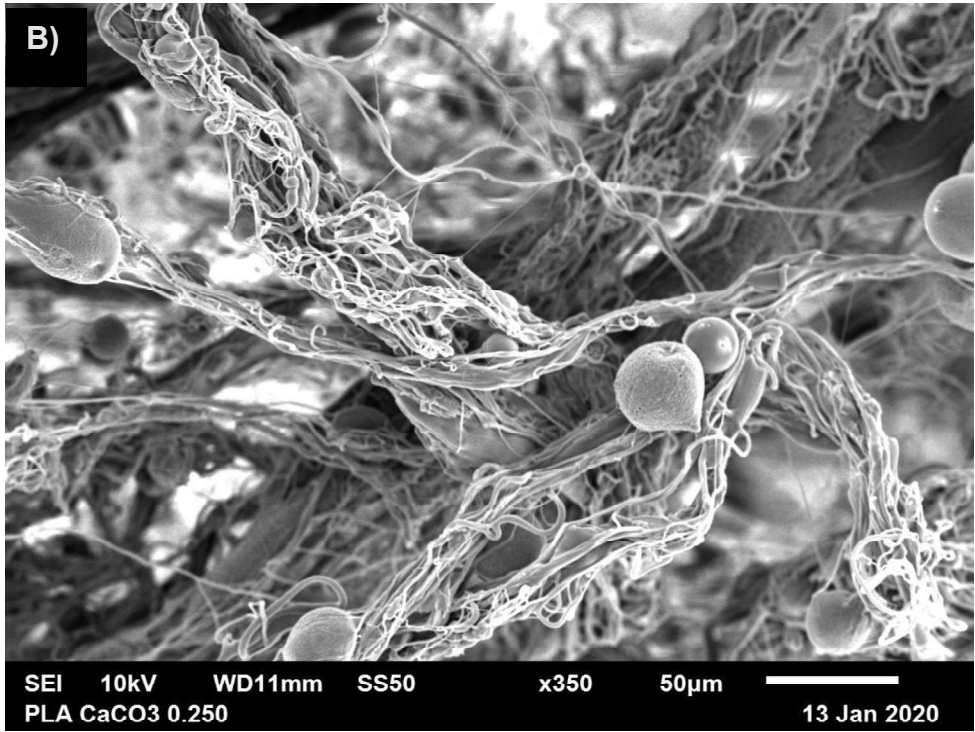
## RESULTADOS

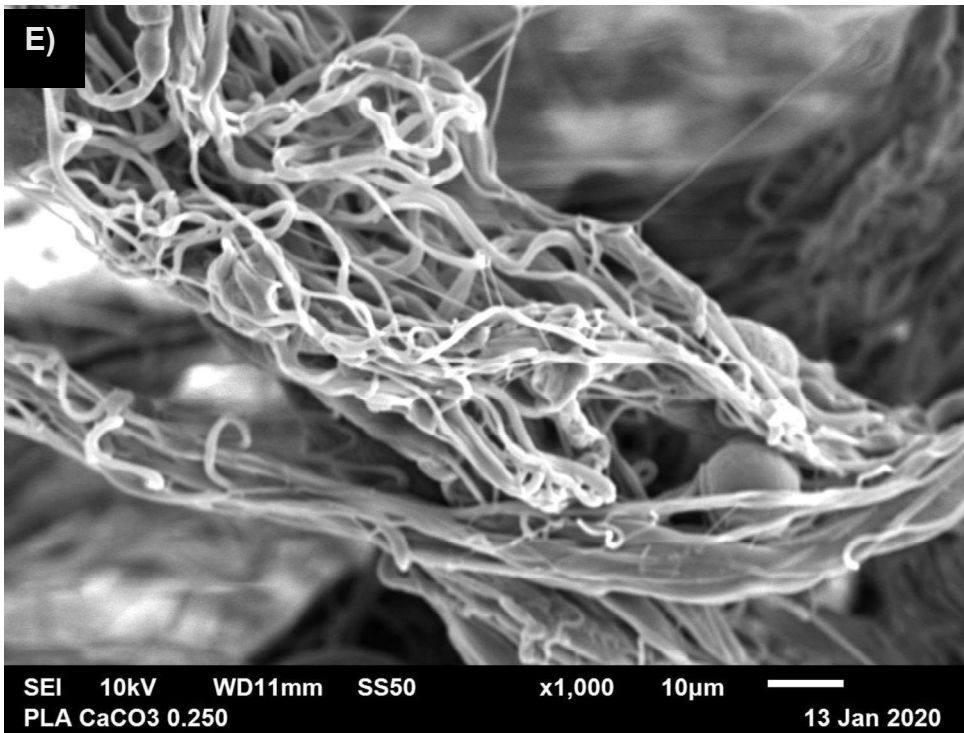
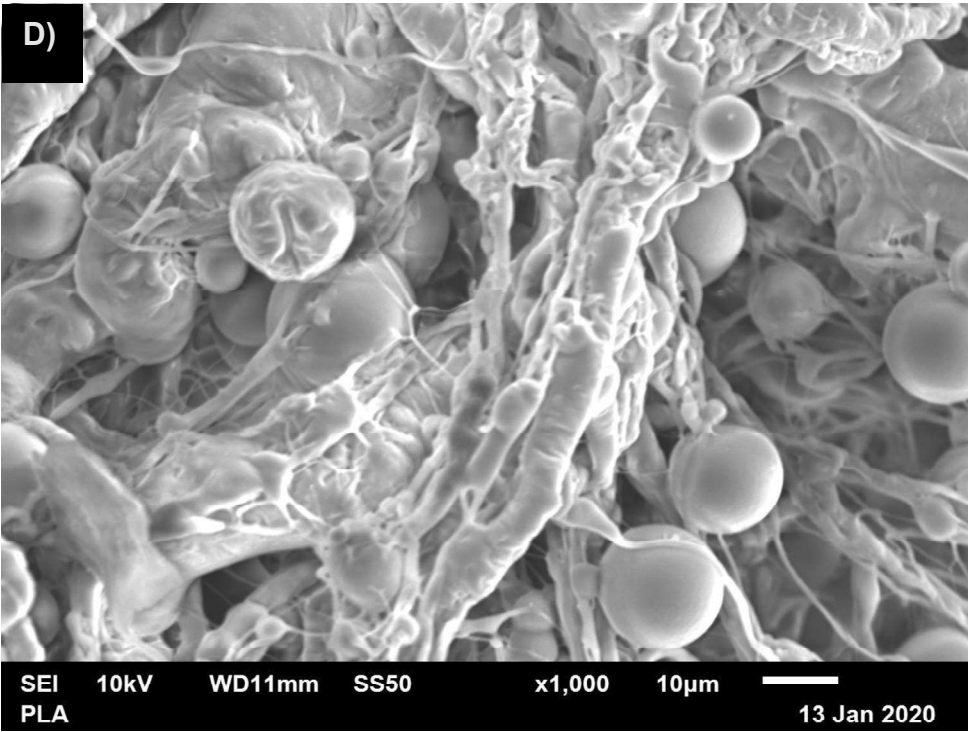
### Caracterización de andamio a base de PLA y PLA con $\text{CaCO}_3$ .

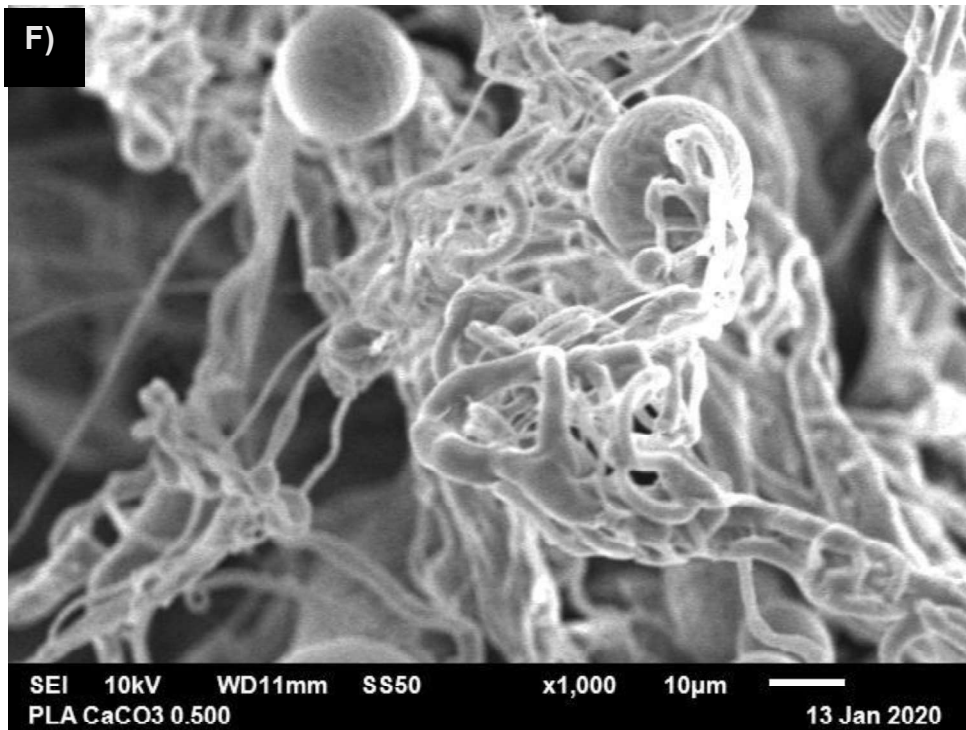
Al observar los andamios en el SEM, en la magnificación de 350x (Fig.1A, 1B, 1C) se puede apreciar una red de fibras o hilos finos con pequeñas micropartículas distribuidas entre los mismos. En la magnificación 1,000x (Fig. 1D,1E,1F), se puede observar que estas micropartículas tienen una forma esférica sobre los hilos o fibras de cada andamio. En la figura 1D se observa una mayor cantidad de micropartículas, en la relación con las figuras 1E, 1F.









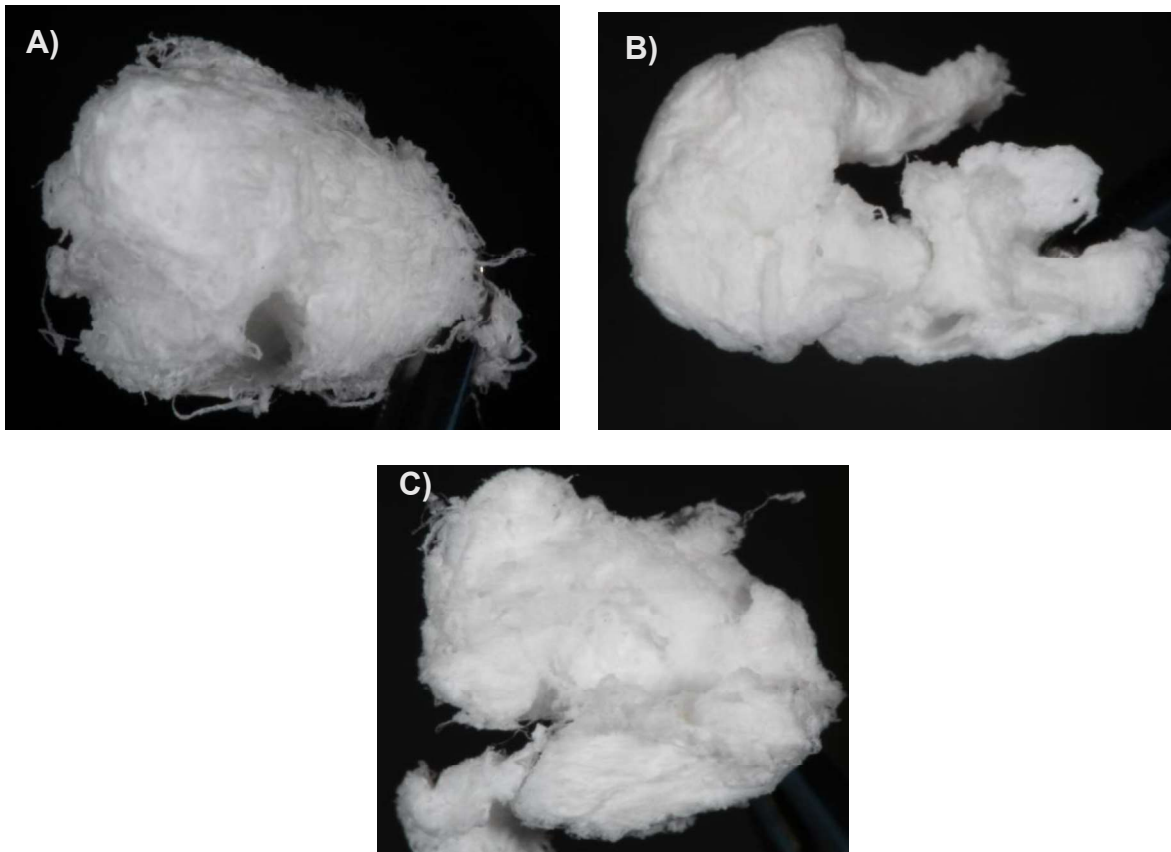


*Figura 9 . Fotografías tomadas con microscopio electrónico de barrido (MEB) de cada andamio a magnificaciones 350x y 1,000x. A) Andamio de PLA a 350x. B) Andamio de PLA+ CaCO3 .250 mg a 350x. C) Andamio de PLA+CaCO3 .500 mg a 350x. D) Andamio de PLA a 1,000x. E) Andamio de PLA+CaCO3 .250 mg a 1,000x. F) Andamio de PLA+CaCO3 .500 mg a 1,000x.*

### Degradación de andamio de PLA Y PLA con CaCO<sub>3</sub>

El peso registrado de cada andamio (PLA, PLA+ CaCO<sub>3</sub> 250 mg, PLA+ CaCO<sub>3</sub> 500 mg) fue registrado a diferentes intervalos de tiempo: 0, 7, 14, 21, 30 días, así como también el pH. En la figura 3A, 3B, 3C se pueden observar el aspecto físico de los andamios transcurridos 7 días en solución PBS.

Los datos obtenidos del peso registraron un mayor aumento del peso de cada andamio al transcurrir el tiempo y el pH se mantuvo estable en los diferentes intervalos de tiempo. (Tabla II )



*Figura 10 Fotografías tomadas de degradación de los andamios posterior a 7 días en PBS. A) Andamio de PLA, B) Andamio de PLA+CaCO<sub>3</sub> . 250 mg, C) Andamio PLA+CaCO<sub>3</sub> .500 mg.*

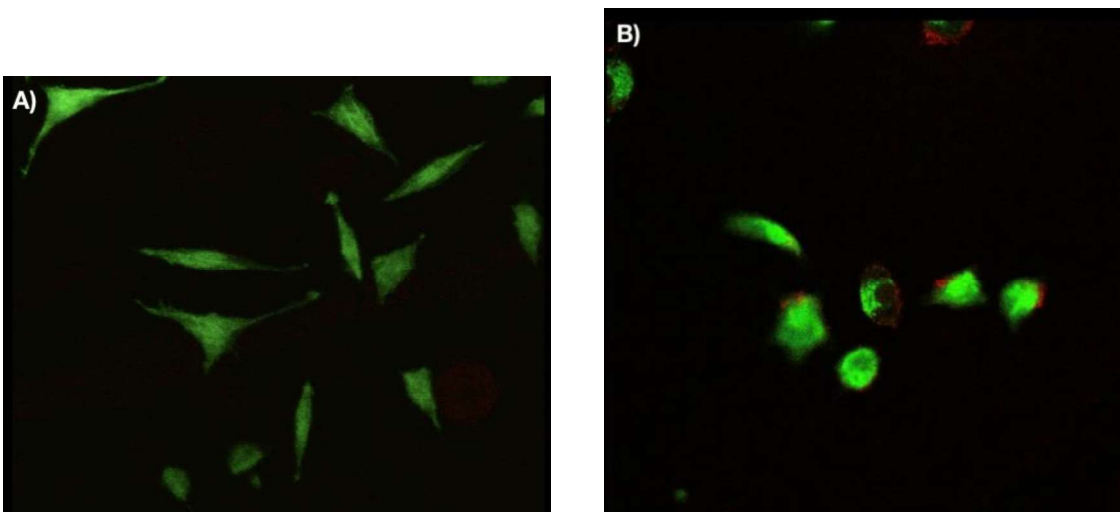
	<b>0 días</b>	<b>7 días</b>	<b>14 días</b>	<b>21 días</b>	<b>30 días</b>	<b>pH</b>
PLA	25	35.0	34.7	37.3	42.5	7
PLA+CaCO3 .250 mg	25	30.1	33.8	38.4	42.3	7
PLA+CaCO3 .500 mg	25	35.2	33.4	37.3	41.6	7

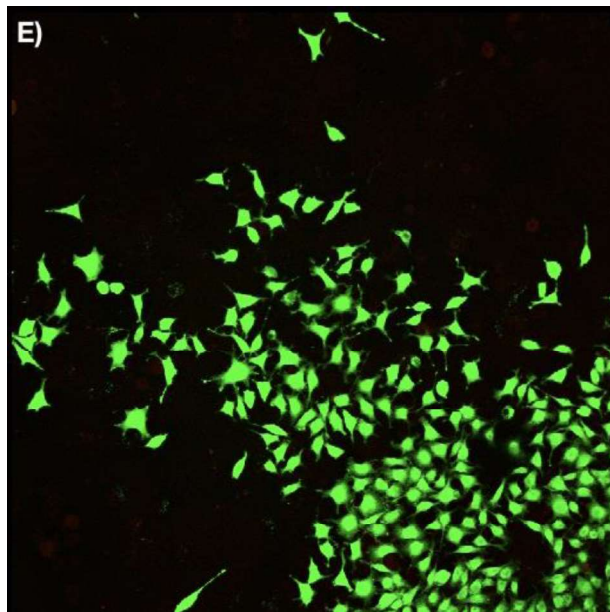
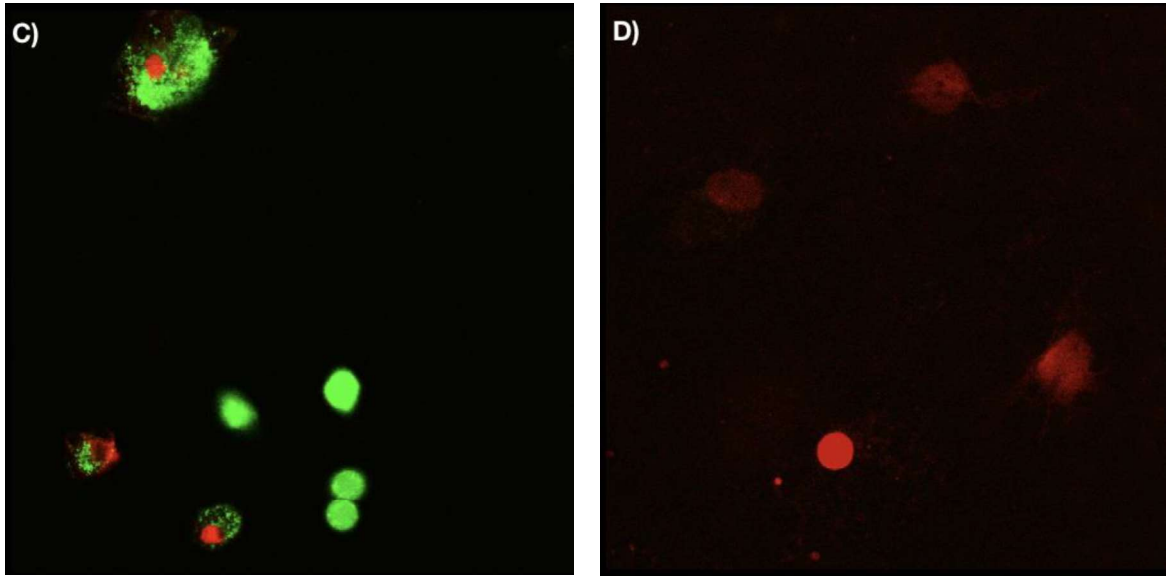
*Tabla 2 Degradación Andamios.*

## Ensayo de Vida/Muerte™

La viabilidad de las células en los andamios de PLA cargado con  $\text{CaCO}_3$  a diferentes concentraciones fue evaluado mediante la prueba Vida/Muerte. La viabilidad celular se determina por dos tinciones simultáneas; en donde las células se distinguen por la presencia de actividad de esterasa intracelular determinada por la conversión enzimática de la calceína AM y Ethidium (Eth-1). La calceína es retenida dentro de las células vivas, produciendo una fluorescencia verde intensa y el (Eth-1) ingresa a las células con membranas dañadas, produciendo así una fluorescencia roja brillante en las células muertas. Las células se incubaron durante 24 horas y con los reactivos de trabajo se incubaron durante un periodo de 30 minutos antes de ser evaluados en el microscopio de escaneo láser confocal (CLSM). Los resultados se observan en la Fig.4 (40x magnificación) para los diferentes grupos.

En las imágenes obtenidas mediante el microscopio confocal se puede observar que las células (osteoblastos) se encuentran distribuidas en los eluidos de los andamios en las diferentes concentraciones (Fig.4A,4B,4C,4D,4E). Se puede observar la viabilidad de las células en los andamios de PLA con diferentes concentraciones de  $\text{CaCO}_3$ , así como en el andamio de PLA.





*Figura 11 Viabilidad celular osteoblastos. A) Andamio de PLA, B) Andamio de PLA+CaCO<sub>3</sub> .250 mg. C) Andamio de PLA+CaCO<sub>3</sub> .500 mg. D) Control Negativo, E) Control Positivo.*

## **Ensayo de proliferación celular no radiactiva AQueous CellTiter96 ®**

La proliferación celular se evaluó mediante la prueba MTS. Los datos descriptivos de cada andamio y los grupos controles positivo y negativo se muestran en la tabla II.

El análisis cuantitativo de los datos fue evaluado mediante Shapiro-Wilks para determinar la normalidad de los datos, con un valor ( $P < 0.050$ ), por lo que se consideró una distribución de datos anormal.

Se realizó una prueba no paramétrica t-student donde se obtuvo un valor de ( $p \leq 0.05$ ) lo que indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio. (Tabla III)

Cuando se compara el grupo PLA+CaCO<sub>3</sub> 500 mg contra el control positivo identificamos que, si existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos, por lo que podemos determinar que esta combinación de materiales no influye negativamente sobre la proliferación celular de osteoblastos cuando son cultivados sobre este material. Cuando comparamos el grupo PLA+CaCO<sub>3</sub> 500 mg contra el grupo de PLA si hay diferencia estadísticamente significativa, por lo cual asumimos que se debe al añadir la concentración de CaCO<sub>3</sub> se da una mayor proliferación celular de osteoblastos que cuando solo hay presencia de PLA. Al comparar el grupo de PLA+CaCO<sub>3</sub> 500 mg con el control negativo si se encuentra diferencia estadísticamente significativa por lo cual determinamos que nuestro material tiene efectos positivos en la proliferación celular de osteoblastos. Cuando se compara el control positivo con el control negativo se identifica diferencia estadísticamente significativa lo cual nos indica que los osteoblastos durante el ensayo de proliferación celular se encontraban en condiciones de vida. Cuando se compara el PLA con el control positivo hay diferencia estadísticamente significativa asumiendo que se debe a las condiciones que proporciona el PLA. Al comparar el grupo de PLA+CaCO<sub>3</sub> 250 mg con el control positivo no hay diferencia estadísticamente significativa, asumiendo que este material al tener mayor cantidad de PLA interfiere en la adhesión celular de osteoblastos.



Así mismo al comparar el grupo de PLA+CaCO<sub>3</sub> 250 mg con el control negativo si hay diferencia estadísticamente significativa. Al comparar el grupo de PLA+CaCO<sub>3</sub> 250 mg con el grupo de PLA identificamos que no hay diferencia estadísticamente significativa. Y finalmente cuando comparamos el grupo de PLA con el control Negativo no hay una diferencia estadísticamente significativa entre ambos, por lo que definimos que se deba a que el PLA tiene una baja adhesión celular. (Tabla IV).

<b>VARIABLE</b>	<b>MEDIA</b>	<b>ERROR</b>	<b>DESVIACION ESTANDAR</b>	<b>VALOR MINIMO</b>	<b>VALOR MAXIMO</b>
C+	0,44598	0,00748	0,01833	0,42750	0,47950
C-	0,23280	0,01510	0,03690	0,18770	0,29950
PLA	0,26230	0,02280	0,05580	0,15730	0,32360
PLA+ CaCO <sub>3</sub> .250 mg	0,33570	0,05340	0,13080	0,13440	0,54090
PLA+CaCO <sub>3</sub> .500 mg	0,51970	0,03080	0,07550	0,41690	0,65020

*Tabla 3 Datos descriptivos de los grupos de estudio en proliferación celular.*

<b>GRUPOS DE ESTUDIO</b>	<b>VALOR P</b>
C+ VS C-	0,000*
C+ VS PLA	0,001*
C+ VS PLA+CaCO <sub>3</sub> .250	0,089
C+ VS PLA+ CaCO <sub>3</sub> .500	0,037*
C- VS PLA	0,267
C- VS PLA+ CaCO <sub>3</sub> .250	0,065
C- VS PLA+ CaCO <sub>3</sub> .500	0,000*
PLA VS PLA + CaCO <sub>3</sub> .250	0,211
PLA VS PLA+ CaCO <sub>3</sub> .500	0,004*
PLA+CaCO <sub>3</sub> .250 VS PLA+ CaCO <sub>3</sub> .500	0,021*

*Tabla 4 Comparaciones entre grupos de estudio de proliferación celular.*

\*El asterisco denota la significancia estadística ( $p \leq 0.05$ )

**Evaluación del efecto de los andamios de PLA y PLA con CaCO<sub>3</sub> sobre los tiempos de Protrombina (PT) y Tromboplastina Parcial Activada (APTT) con BioBas 10.**

Para el análisis del efecto de los andamios de PLA y PLA+CaCO<sub>3</sub> se realizó la estadística descriptiva de los grupos de estudio determinando la media, error de la media, desviación estándar, valor mínimo y máximo (Tabla IV). Al realizar las comparaciones entre los grupos de estudio no se identificó significancia estadística entre ellos, por lo cual asumimos que no ninguno de los andamios interfiere negativamente en la coagulación. (Tabla V)

ANDAMIO	VARIABLE	MEDIA	ERROR DE LA MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
PLA	PT	10,900	0,1690	0,4150	10,400	11,500
	PT(INR)	0,9250	0,0189	0,0464	0,8700	0,9900
	PT%	113,52	3,5500	8,6900	101,70	124,50
	ATTP	28,520	1,4900	3,6600	23,800	32,200
PLA+CaCO <sub>3</sub> .250 MG	ATTP RATIO	1,0367	0,0539	0,1320	0,8700	1,1700
	PT	10,950	0,2140	0,5240	10,400	11,700
	PT(INR)	0,9300	0,0235	0,0576	0,8700	1,0100
	PT%	112,78	4,3500	10,640	98,400	124,50
PLA+CaCO <sub>3</sub> .500 MG	ATTP	27,700	1,2200	2,9900	24,400	31,200
	ATTP RATIO	1,0067	0,0446	0,1093	0,8800	1,1300
	PT	10,817	0,1450	0,3540	10,400	11,200
	PT(INR)	0,9167	0,0167	0,0408	0,8700	0,9600
PLA+CaCO <sub>3</sub> .500 MG	PT%	115,15	3,1600	7,7300	107,00	124,50
	ATTP RATIO	1,0100	0,0494	0,1210	0,8800	1,1200

*Tabla 5 Datos Descriptivos PT Y ATTP.*

<b>VARIABLE</b>	<b>PLA+CaCO<sub>3</sub> .250 VS PLA+CaCO<sub>3</sub>.500</b>	<b>PLA+CaCO<sub>3</sub>.250 VS PLA</b>	<b>PLA VS PLA+CaCO<sub>3</sub>.500</b>
<b>PT</b>	0,249	0,749	0,289
<b>PT(INR)</b>	0,249	0,749	0,289
<b>PT%</b>	0,257	0,809	0,319
<b>ATTP</b>	0,938	0,096	0,172
<b>ATTP RATIO</b>	0,837	0,060	0,191

*Tabla 6 Comparación entre grupos*

## DISCUSIÓN

La formulación del biomaterial a base de PLA cargado con  $\text{CaCO}_3$  a las concentraciones de 250 mg y 500 mg mediante la técnica de spray-dryer dio como resultado un andamio 3D. De acuerdo con el resultado de una búsqueda en la literatura, no se encuentran estudios en los que se haya explorado un sistema 3D parecido. Tiene una estructura de hilos o fibras, debido a estas características que presenta, decidimos llamarlo “algodón”. La estructura de este algodón de PLA y de PLA con las diferentes concentraciones de  $\text{CaCO}_3$  al ser observarlas en el SEM a una magnificación de 350x se observa una red de hilos o fibras con la presencia de micropartículas, siendo estas últimas más notorias en el andamio de PLA. Pavanetto y cols.1993 reportaron mediante la técnica de Spray-dryer la formulación de micropartículas de PLA que al ser evaluadas por SEM el diámetro más grande fue de 3  $\mu\text{m}$ , el peso molecular del PLA utilizado dio como resultado la forma esférica de las micropartículas, de igual manera se formaron dichas micropartículas, ya que el PLA utilizado fue en nuestros andamios fue del mismo peso molecular que el reportado en su estudio, siendo así un andamio de doble sistema, por la presencia de hilos o fibras y micropartículas. Tavangar y cols. 2012 reportaron la fabricación de nanofibras 3D de  $\text{CaCO}_3$  con láser femtosegundo sugiriéndolo, así como un biomaterial prometedor para realizar andamios que apoyen la formación de hueso y otras aplicaciones médicas. Sin embargo, mediante la técnica spray-dryer no se encuentran estudios en los que aparezca un sistema de hilos y además micropartículas. Nuestros resultados de los andamios de PLA y PLA con  $\text{CaCO}_3$  fueron degradados en PBS a diferentes intervalos de tiempo, conforme transcurrían el tiempo el peso de cada andamio aumento de manera similar en los tres andamios hasta la cuarta semana que fue evaluado, tal vez debido a que el comportamiento de los andamios no se altera al añadir el  $\text{CaCO}_3$  coincidiendo con lo reportado por Bleach y cols. 2001 quienes concluyen que al añadir partículas de fosfato tricálcico con PLA, no se altera el tiempo de la degradación hidrolítica al ser colocadas en PBS.

Los andamios en ingeniería de tejidos usan PLA como componente debido a las características que posee, realizando así mezclas con otros polímeros o copolímeros naturales o sintéticos que ofrecen características específicas para los tejidos. Además, porque el PLA ha mostrado ser un material que no afecta en la viabilidad celular.

La viabilidad de celular de los osteoblastos durante su exposición a los andamios de PLA y PLA con  $\text{CaCO}_3$  fue positiva. De tal manera, establecemos que el algodón de PLA a las diferentes concentraciones de  $\text{CaCO}_3$  no es un material citotóxico. Al contrario, el algodón con  $\text{CaCO}_3$  promovió la proliferación de células, lo que puede explicarse con los resultados en la prueba de viabilidad celular. En nuestro estudio no evaluamos mecanismos celulares específicos que pueden asociarse al estímulo de la proliferación celular. Se ha reportado que el  $\text{CaCO}_3$  favorece la proliferación de células osteoblásticas por mecanismos de segundo mensajero, eso puede explicar nuestros resultados. Lasprilla y cols. 2012 mencionan que el PLA ha sido utilizado como un andamio poroso para el crecimiento de tejido nuevo. Coutu y cols. 2009, Papenburg y cols. 2009 crearon andamios tridimensionales de PLA para cultivar diferentes tipos de células, tejido muscular, regeneración de hueso y cartílago y otros tratamientos cardiovasculares, neurológicos y ortopédicos. Velioglu y cols. 2018 Diomedede y cols. 2012, realizaron andamios impresos en 3D de PLA para reparación y regeneración ósea, los cuales mostraron que dependiendo del tamaño del poro del andamio aumenta o disminuye la proliferación celular, siendo así una plataforma para el tejido óseo. Si bien, nosotros no podemos decir que el sistema de algodón es poroso, sí encontramos que el sistema tiene una conformación en red, que forma una matriz que permite la adhesión celular, lo que pudo ser también un estímulo para la proliferación celular.

La proliferación celular de osteoblastos en los andamios de PLA blanco y PLA+ $\text{CaCO}_3$  .250 mg. mostraron una baja proliferación celular. Esto porque el PLA es un material hidrófobo que presenta una baja adhesión celular, además que el algodón en su estructura de hilos o fibras es liso, si fuera rugoso podrían adherirse con mayor facilidad las células. En cambio, el PLA con  $\text{CaCO}_3$  .500 mg mostró un aumento en los andamios con  $\text{CaCO}_3$ . En cambio, el  $\text{CaCO}_3$  al estar en contacto con los

osteoblastos presentan un alto depósito de calcio extracelular interfiriendo así en un aumento de la proliferación celular. Shafiu y cols. en 2014 demostraron que al utilizar el  $\text{CaCO}_3$  como nanocristales es un biomaterial prometedor y potencial debido a sus efectos positivos en el aumento de fosfatasa alcalina, síntesis de proteínas y depósito de calcio extracelular con las líneas celulares de osteoblastos.

La evaluación de la hemocompatibilidad es poco explorada para el área de biomateriales para uso en boca, porque muchos de los materiales dentales no entran en contacto con sangre. Sin embargo, los biomateriales que pretenden colocarse en un lecho quirúrgico o en un alvéolo luego de una extracción dental, deben ser evaluados en su efecto en la coagulación. Si el biomaterial inhibe la formación del coágulo sanguíneo, entonces será un biomaterial inadecuado para un uso *in vivo*. En cambio, si el biomaterial no afecta la coagulación sanguínea, entonces el biomaterial puede emplearse. Podría también ocurrir que el biomaterial promueva la coagulación, lo que sería un *plus* para el biomaterial. En el caso del algodón, tanto en su presentación en blanco como en su presentación en 3D, no se observó que afectara el PT o que el APTT, es decir, no afectó la formación del coágulo de fibrina. Los biomateriales pueden afectar la coagulación de la sangre cuando promueven la adsorción o cuando secuestran a los factores de la coagulación, principalmente por una interacción electrostática entre cargas positivas y negativas. Eso no pudo ocurrir en nuestro sistema. También la hidrofobicidad del PLA favorece la no adsorción de proteínas, lo que entonces explica que los factores de la coagulación no fueron atrapados en la matriz de PLA o de PLA y  $\text{CaCO}_3$ . Por lo tanto, la cascada de la coagulación se desarrolló de forma normal en comparación con el grupo control. Li y cols. 2020, concluyeron que las nanopartículas de  $\text{CaCO}_3$  mostraron una buena compatibilidad sanguínea y un suministro sensible al pH de iones de calcio. *In vitro* no indujo coagulación sanguínea a pH 7.0 indicando seguridad en la circulación sanguínea, pero presentó una coagulación sanguínea rápida a pH 5.0. Coincidiendo con los resultados que se obtuvieron del efecto de tiempo de protrombina y tromboplastina donde ninguno de los andamios afectó en dichos tiempos, debido a que el pH de nuestro material es de 7.0 y no se altera en el proceso de degradación.

## LIMITACIONES

Este estudio se limitó a la formulación de 1 sistema 3D de tipo algodón de PLA y 2 sistemas 3D de tipo algodón cargados con carbonato de calcio. Cada una de las muestras fue evaluada en condiciones *in vitro*. De manera que los resultados deben considerarse como un primer acercamiento al conocimiento del biomaterial explorado en este trabajo. La caracterización por SEM mostró la morfología de estructura de la red de hilos y mostró la presencia de micropartículas, pero el diámetro de los hilos no fue medido, tampoco el tamaño de las partículas. El tiempo de PT y APTT fueron evaluados en muestras de dos sujetos adultos sanos, así se encontró que no hubo diferencias entre el PT y el APTT de los grupos experimentales y el grupo control para PT y APTT. Se reconoce que el resultado puede ser diferente entre sujetos, sobre todo si los sujetos presentan alguna alteración biológica que afecte en la coagulación sanguínea.



## CONCLUSIONES

Este estudio presenta una técnica novedosa en la formulación de un biomaterial a base de PLA cargado con  $\text{CaCO}_3$  mediante la técnica spray-dryer. Es un andamio tridimensional, llamándolo así por su aspecto parecido a un “algodón”. Hasta el momento no se conoce algún andamio parecido a este, ya que presenta un doble sistema, de acuerdo a su caracterización se observa la presencia de hilos o fibras y micropartículas que potencializan la proliferación celular. Además de no interferir negativamente en el proceso de coagulación sanguínea debido al pH estable que presenta y la presencia del  $\text{CaCO}_3$ .

## BIBLIOGRAFIA

1. Dawson D V. Effect of Alveolar Ridge Preservation after Tooth Extraction : A Systematic Review. 2016;950–8.
2. F VDW, F DA, Alveolar SDE, Weijden F Van Der. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans : a systematic review. 2009;1048–58.
3. Bartee BK. Bone grafting. :187–93.
4. Chavda S, Levin L. Human Studies of Vertical and Horizontal Alveolar Ridge Augmentation Comparing Different Types of Bone Graft Materials : A Systematic Review. 2018;XLIV:74–85.
5. Darby I. Periodontal materials. 2011;107–18.
6. Kao ST, Scott DD. A Review of Bone Substitutes. 2019;19(2007):513–21.
7. Jazayeri HE, Fahmy MD, Razavi M, Stein BE, Nowman A, Masri RM, et al. Dental Applications of Natural-Origin Polymers in Hard and Soft Tissue Engineering. 2016;25:510–7.
8. Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature. Dent Mater. 2008;24(2):149–64.
9. Saini P, Arora M, Kumar MNVR. Poly ( lactic acid ) blends in biomedical applications ☆. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2016;107:47–59.
10. Pretula J, Slomkowski S, Penczek S. Polylactides—Methods of synthesis and characterization. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2016;
11. Lee BK, Yun Y, Park K. PLA micro- and nano-particles. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2016;107:176–91.
12. Basu A, Kunduru KR, Doppalapudi S, Domb AJ, Khan W. Poly(lactic acid) based hydrogels. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2016;
13. Ki È, To P, La È, Kelloma M. Effect of ® ller type on the mechanical properties of self-reinforced polylactide ± calcium phosphate composites. 2:911–5.
14. Gutiérrez-sánchez M, Escobar-barríos VA, Pozos-guillén A, Escobar-garcía DM. Materials Science & Engineering C RGD-functionalization of PLA / starch sca ff olds obtained by electrospinning and evaluated in vitro for potential bone regeneration. Mater Sci Eng C [Internet]. 2019;96(December 2018):798–806.
15. Cal K, Sollohub K. Spray Drying Technique . I : Hardware and Process Parameters. 2010;99(2):575–86.
16. Arpagaus C, Collenberg A, Rütli D, Assadpour E, Jafari SM. Nano Spray Drying for Encapsulation of Pharmaceuticals. Int J Pharm [Internet]. 2018.
17. Heng D, Lee SH, Ng WK, Tan RBH. The nano spray dryer B-90. 2011;965–72.
18. F.Pavanetto, I.Genta, P.Giunchedi BC. Evaluation of spray drying as a method for polylactide and polylactide-co-glycolide microsphere preparation. J Microencapsul. 1993;10(4):487–97.
19. Omari MMH AI, Rashid IS, Qinna NA, Jaber AM. Calcium Carbonate [Internet]. 1st ed. Vol. 41, Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology. Elsevier Inc.; 2016. 31-132 p.
20. Tavangar A, Tan B, Venkatakrishnan K. Synthesis of three-dimensional calcium carbonate nanofibrous structure from eggshell using femtosecond laser

- ablation. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 2011;9(1):1.
21. Takeuchi N, Machigashira M, Yamashita D, Shirakata Y, Kasuga T. Cellular compatibility of a gamma-irradiated modified siloxane-poly ( lactic acid ) - calcium carbonate hybrid membrane for guided bone regeneration. 2011;30(5):730–8.
  22. Kudryavtseva VL, Zhao L, Tverdokhlebov SI, Sukhorukov GB. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Fabrication of PLA / CaCO<sub>3</sub> hybrid micro-particles as carriers for water-soluble bioactive molecules. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2017;157:481–9.
  23. Douglas TEL, Agata Ł, Samal SK, Declercq HA, Schaubroeck D, Mendes AC, et al. Enzymatic , urease-mediated mineralization of gellan gum hydrogel with calcium carbonate , magnesium- enriched calcium carbonate and magnesium carbonate for bone regeneration applications. 2017;
  24. Kamba AS, Abu Z, Zakaria B. Osteoblasts Growth Behaviour on Bio-Based Calcium Carbonate Aragonite Nanocrystal. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
  25. Huiru Lia, Xinyue Zhang XL. *Materials Chemistry B. J Mater Chem B*. 2020;
  26. Bhattacharjee P, Kundu B, Naskar D, Kim H, Maiti TK, Bhattacharya D, et al. *Acta Biomaterialia* Silk scaffolds in bone tissue engineering : An overview. *Acta Biomater* [Internet]. 2017;
  27. Goracinova K, Sema C. 5-Fluorouracil-loaded PLA/PLGA PEG–PPG–PEG polymeric nanoparticles: formulation, in vitro characterization and cell culture studies \_ . *Drug Dev Ind Pharm Early Online*. 2013;9045:1–8.
  28. Danoux CB, Barbieri D, Yuan H, Bruijn JD De, Blitterswijk CA Van, Habibovic P. In vitro and in vivo bioactivity assessment of a polylactic acid / hydroxyapatite composite for bone regeneration. *landes Bioscience*. 2014;1–13.
  29. Lazzeri L, Grazia AEM. Gelatine / PLLA sponge-like scaffolds : morphological and biological characterization. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;1399–405.
  30. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers : biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *J Biomater*. 2003;24:4385–415.
  31. Guduric V, Bareille R, Latour S, Gr A, Nicolas L, Fricain J, et al. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. 2017;887–94.
  32. Sanjeev Palta, Rich Saroa AP. Overview of the coagulation system. *indian J Anaesth*. 2014;58(5):515–23.
  33. Martinuzzo ME. Pruebas de laboratorio para la evaluación de la hemostasia : fundamentos básicos. *Hematología*. 2017;56–68.