



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

RESPUESTA TISULAR EN RATAS WISTAR A ANDAMIOS
DE PLA IMPRESOS EN 3D.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

P R E S E N T A:

BIANCA MONTSERRAT AZPEITIA SÁNCHEZ

TUTORA: Dra. JANETH SERRANO BELLO

ASESORA: Dra. PATRICIA GONZÁLEZ ALVA

Cd. Mx.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradezco primeramente a mi familia por estar siempre a mi lado en las conquistas y en las dificultades de mi vida.

A mis padres, **Gabriela Azpeitia Sánchez Y Gopala Pillai Narayana**, que me dan educación, cariño y amor incondicional. Ustedes fueron los mejores ejemplos de carácter, honestidad, dedicación y persistencia que he tenido. Gracias por ayudarme a cumplir siempre mis metas.

A mi hermano, **Christian Aaron Azpeitia Sánchez**, por el cariño, la confianza y por estar cerca cuando lo necesito. Eres mi ejemplo a seguir.

A mis amigos de carrera **Xiadani, Mariana, Ívan y María Fernanda**, sin duda son lo mejor que me llevo en esta formación profesional, vivimos intensas jornadas de estudios, desvelos, pero juntos logramos una meta más, agradezco su paciencia, apoyo y su sincera amistad.

A **Marco Antonio Tamayo Gallardo** gracias por ser parte de esta gran etapa de mi vida, por el apoyo, paciencia, comprensión y confianza. Por creer en mí, ¡Gracias!

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por la oportunidad que me brindó para desarrollar mis actividades y preparación en la Facultad de Odontología.

A la **Dra. Janeth Serrano Bello**, muchas gracias por estar siempre disponible para atenderme, discutir los casos, resolver mis dudas y por la confianza depositada en mí.

Al **Dra. Patricia González Alva**, mis sinceros agradecimientos

A la unidad de Bioterio de la facultad de Medicina, UNA, en particular al **Dr. Enrique Pinzón Estrada**, jefe de la misma, así como al **M.V.Z Ismael Torres Saldaña**, al **M.V.Z Víctor Manuel Salgado Alfaro** y a la Unidad de Bioterio de la DEPEl de la FO UNAM, al **Sr. Juan Manuel Trejo Ramírez**.

Trabajo financiado gracias al proyecto **DGAPA-UNAM-PAPIIT IA205818**.

A mi abuelo y familia **Azpeitia Sánchez**, ustedes son la base de todo lo que construí. Gracias por los consejos en las decisiones tomadas, por aceptar y entender mis elecciones, por el apoyo en el crecimiento profesional y en los momentos difíciles; gracias por compartir los momentos de alegría.

A todos aquellos que de forma indirecta contribuyeron para la realización de mis logros, ¡Gracias!

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	4
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS	5
2.2 DEFECTOS ÓSEOS	6
2.2.1 Clasificación de los defectos óseos.....	7
2.2.2 Tratamiento de los defectos óseos.....	10
2.3 ANDAMIOS	14
2.3.1 Bioimpresión de andamios 3D.....	15
2.4 ÁCIDO POLILÁCTICO	16
2.5 BIOCOMPATIBILIDAD	17
III. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS	21
V. OBJETIVOS	22
5.1 OBJETIVO GENERAL	22
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
VI. METODOLOGÍA	23
6.1 MATERIALES	23
6.2 MÉTODO	24
VII. RESULTADOS	27
VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	35
IX. DISCUSIÓN	37
X. CONCLUSIONES	39
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40



I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día en la práctica odontológica es muy común que se presenten pacientes con pérdida dental causada por una pérdida ósea significativa; ya sea asociado a alguna enfermedad sistémica, periodontitis o algún traumatismo.

El mejorar y mantener la calidad y cantidad ósea de la zona es un aspecto muy importante para llevar a cabo una buena rehabilitación protésica, ya que esto dificulta el tratamiento y el éxito. En la actualidad existen diversos tratamientos de regeneración ósea, pero no hay alguno que garantice el relleno total del defecto; por eso, aún se mantiene en búsqueda de nuevos materiales que ofrezcan una biocompatibilidad, regeneración y reabsorción adecuada para una rápida recuperación del tejido y poder así realizar una buena rehabilitación protésica dándole mayor tiempo de vida a los tratamientos.

Actualmente las áreas como la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa han desarrollado alternativas de reemplazo para los tejidos dañados o perdidos. Una de las alternativas ha sido la construcción de andamios con polímeros que permite regenerar la estructura tridimensional del tejido original con la propiedad de ser incorporados al organismo y así reemplazar el tejido faltante. Pero para que estos puedan cumplir con una función, los andamios deben poseer ciertas características que permitan la adhesión de ciertas células para poder regenerarse.

Para estudiar su comportamiento, eficacia y veracidad de los andamios, en este trabajo se analiza la respuesta inflamatoria a los 4, 10 y 21 días mediante cortes histológicos que se obtuvo posterior a la colocación del andamio de poliácido láctico en tejido celular subcutáneo de 15 ratas *Wistar*.



II. MARCO TEÓRICO

2.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos como rama de la bioingeniería, se define como “la aplicación de principios científicos para el diseño, la construcción, modificación, el crecimiento y mantenimiento de los tejidos vivos”^{1,2}

El término tissue engineering (ingeniería tisular) fue adjudicado a esta disciplina nació en 1987, siendo un campo interdisciplinario que se desarrolló como una alternativa al trasplante tradicional de órganos debido a la problemática del rechazo que se presentaba en los pacientes. Partiendo de la capacidad del cuerpo humano para recuperarse de enfermedades y heridas, tomando en cuenta el tejido, el grado del daño, pérdida de la función y el número de tejidos involucrados.^{3,4}

La estrategia de esta área es la construcción de tejidos *in vitro* e *in vivo* mediante biomateriales permitiendo restaurar, sustituir o incrementar las funcionales de los propios tejidos y órganos del cuerpo humano. Siendo una alternativa la colocación de células sobre andamios que son posteriormente implantados en el tejido lesionado para estimular el crecimiento de nuevo tejido.^{2,3,4}

Para lograr la regeneración tisular, se han desarrollado nuevos biomateriales capaces de estimular una respuesta biológica necesaria para restablecer las funciones de un tejido dañado como en los materiales poliméricos para la



RESPUESTA TISULAR EN RATAS *Wistar* A ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



construcción de andamios. Las investigaciones actuales han mostrado que los andamios poliméricos imitan la función de la matriz extracelular, teniendo una versatilidad química y un buen rendimiento biológico.

Tejidos probados en estos materiales y con resultados centrados en la regeneración y recuperación de tejidos y que han estado más enmarcados en los últimos tiempos en cuanto a tejidos han sido el óseo, piel y cartílago.⁵

Uno de los tejidos más probados mediante la regeneración ha sido la estructura de la matriz extracelular del hueso, en combinación con proteínas y polisacáridos que se encuentran integrados en los cristales de hidroxiapatita y organizados de forma rígida de acuerdo a una arquitectura mediante andamios impresos en 3D.^{1, 4}

2.2 DEFECTOS ÓSEOS

Un factor importante para una rehabilitación protésica fija, removible, total o mediante implantes, es contar con un reborde alveolar de tamaño y grosor adecuado para lograr una exitosa rehabilitación; de no ser así se podría recurrir a tratamientos quirúrgicos para corregir el defecto y la pérdida del tejido.

Las causas más comunes de la pérdida ósea en cavidad oral son: inflamación de los tejidos periodontales de soporte, provocada por trauma oclusal, trastornos sistémicos y factores que determinan la morfología en la enfermedad periodontal.^{6, 7}

Pero la principal causa de pérdida ósea en los pacientes a nivel mundial en el área odontológica se debe a la periodontitis. Esta una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a los tejidos de soporte de los dientes, la cual es provocada por la colonización bacteriana que se introduce en los tejidos y causan cambios progresivamente destructivos. La presencia de lesiones óseas periodontales, clínicamente puede asociarse a la pérdida de hueso de soporte del diente o a la destrucción periodontal en zonas específicas y a la posible aparición de nichos ecológicos (bolsas profundas y lesiones de furca) asociadas a lesiones óseas que pueden representar factores de riesgo en sitios específicos o ser indicadores de la progresión de la enfermedad. ⁶

2.2.1 Clasificación de los defectos óseos

Goldman y Cohen clasifican los defectos óseos periodontales en sitios específicos; estos se producen en tres formas diferentes:

- ▶ Defectos supraóseos: defecto patológico en el que la base del defecto está localizada coronal a la cresta ósea remanente.(figura 1) ^{6,8}

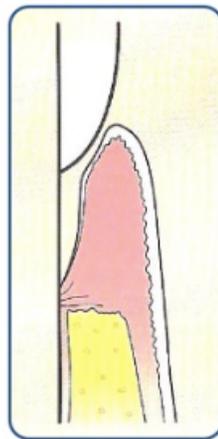


Figura 1. Defecto supraóseos.

- ▶ Defectos infraóseos o verticales: “los defectos infraóseos son aquellos en los que la localización apical de la base de la bolsa con respecto a la cresta residual”⁶. Se caracterizan por una pérdida vertical de hueso, existiendo mayor pérdida en un diente específico.^{6,8}

En esta clasificación se pueden reconocer dos tipos de defectos:

- a) Defectos intraóseos: clasificados en el número de paredes óseas residuales afectadas de un solo diente, tomando el ancho del defecto y extensión topográfica alrededor de la raíz. ⁶ Figura 2



Figura 2. Defectos intraóseos. **A.** Defecto intraóseo de una pared. **B)** Defecto intraóseo de dos paredes. **C)** Defecto intraóseo de tres paredes. ⁸

- b) Cráteres: defecto en forma de copa localizada en hueso alveolar interdental con pérdida de hueso casi igual en las raíces de dos dientes contiguos y con una localización más coronal de la cresta vestibular y lingual o palatina. ^{6,7} Figura 3.

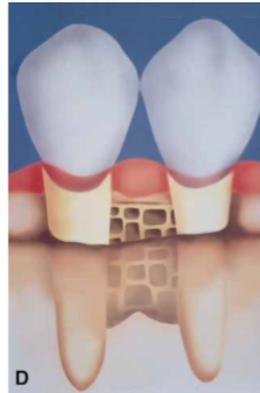


Figura 3. Defecto Cráter. ⁸

- ▶ Defectos interradiculares o de furcación: reabsorciones patológicas en la furca en dientes multirradiculares.

Diversos autores han clasificado este defecto de acuerdo al grado de afectación o nivel de compromiso del área furca.

Hamp, Lindhe y Nyman han clasificado el nivel de compromiso de la furcación o la magnitud de acuerdo con la cantidad de destrucción de los tejidos, éstos se clasifican en:

- Grado I: Existe pérdida horizontal de soporte periodontal donde no excede 1/3 del ancho total del diente.
- Grado II: Sobrepasa 1/3 del ancho del diente, pero no abarca el ancho total en el área de la furcación.
- Grado III: Existe una destrucción completa del soporte periodontal de "lado a lado" en el área de furcación.⁹

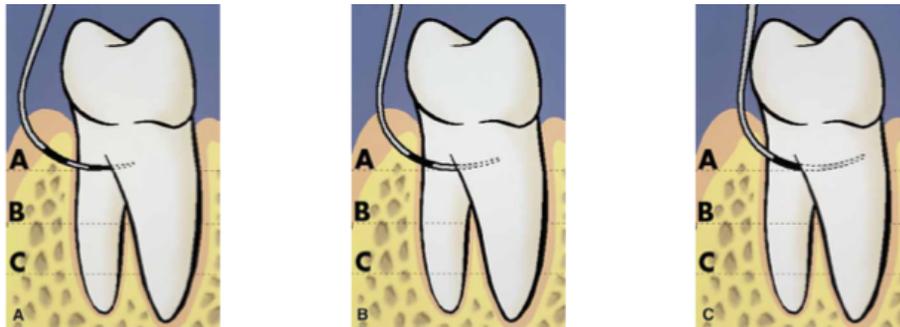


Figura 4. Clasificación horizontal del compromiso de la furca. ⁸

2.2.2 Tratamiento de los defectos óseos

El hueso es el único tejido del organismo que al ser dañado es capaz de regenerarse por medio de la creación de un tejido exactamente igual al original. De esta manera, cuando el hueso presenta fracturas u otros defectos, se pone en marcha la formación de células osteoformadoras para restaurar el tejido en la zona de lesión.

Para el tratamiento de los tejidos perdidos por la enfermedad periodontal, hoy en día existen varias opciones para poder rehabilitar las zonas dañadas. Estos tratamientos varían dependiendo de la severidad de la enfermedad, la extensión de la pérdida ósea y la presencia o ausencia de bolsas periodontales. Actualmente, con la terapéutica se desea obtener una regeneración de las estructuras perdidas por efecto de la enfermedad.

La regeneración periodontal es una opción en la estrategia del tratamiento, que tiene como objetivo reconstruir los tejidos periodontales perdidos mediante injertos óseos, para poder aplicarlo es necesario tener un control previo de la causa y de la patogenia del proceso destructivo con el fin de obtener un área



clínica favorable para que los tejidos del periodonto logren su capacidad de regeneración. ^{10,11}

A lo largo de los años, se han utilizado numerosos tipos de injertos para tratar los defectos y conseguir regeneración periodontal. En el caso los injertos óseos se obtiene un relleno del defecto, con contacto directo del hueso sobre la raíz dental.

Según el criterio, los injertos se han clasificado en:

- Autoinjertos: se comprende por tejido tomado por el mismo individuo y proporciona mejores resultados, ya que cumple con los tres mecanismos de regeneración (osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción) y evita la transmisión de enfermedades.

Entre las zonas más comunes donde se puede obtener el injerto intraoral se encuentra el mentón, tuberosidad del maxilar, rama ascendente de la mandíbula, zona edéntula del maxilar, torus y alveolos post extracción; y para zonas extraorales donde sea tomar mayor cantidad de material se puede extraerse de cresta ilíaca, tibia o calota. ^{10,12} Figura 5



Figura 5. Injerto óseo en zona mandibular y cuerpo de la mandíbula. ¹³

- Aloinjertos: es tomado por un donante y utilizado en otro individuo de la misma especie. Este solo cuenta con capacidad osteoinductiva y osteoconductora. Las ventajas del aloinjerto incluyen su disponibilidad en cantidades importantes y diferentes formas y tamaños y no se sacrifican estructuras del huésped. ¹⁰ Figura 6

Se pueden clasificar según su procesamiento en:

- a) Aloinjertos congelados.
- b) Aloinjerto liofilizado (secado en frío).
- c) Aloinjerto liofilizado desmineralizado.
- d) Hueso irradiado.



Figura 6. Representación de Aloinjerto. Modificado^{14,15,16}

- Xenoinjertos: es de origen animal, generalmente es tomado de bovino o coral por su tener una alta similitud con el hueso humano. Una vez obtenido este hueso, debe ser tratado, esterilizado y liofilizado, para evitar la transmisión de patologías de la especie donante. ^{10,12} Figura 7



Figura 7. Representación de xenoinjerto en animal bovino. ¹⁷

- Injertos aloplásticos: provenientes de materiales fabricados sintéticamente con características osteoconductoras. Se encuentran en variadas formas, tamaños y texturas y sus respuestas biológicas dependerá de las técnicas de fabricación, la cristalinidad y porosidad del material construido. ¹⁸

Los diferentes tipos de injertos pueden actuar sobre el hueso huésped por tres mecanismos:

- Osteogénesis: formación de hueso nuevo mediante los osteoblastos contenidos en el injerto trasplantado.
- Osteoconducción: las células madres residentes son reclutadas para la formar hueso nuevo.
- Osteoinducción: formación de hueso mediante el cual el material es capaz de transformar las células diferenciadas en osteoblastos. ^{10,18}



2.3 ANDAMIOS

Una de las alternativas actuales para el tratamiento de defectos óseos en investigación realizada en la ingeniería de tejidos han sido los andamios impresos en 3D.

Estos andamios son soportes o estructuras tridimensionales temporales, en los que las células crecen, se adhieren, proliferan y se diferencian, actuando así como matriz extracelular. Su empleo principal es estimular y dirigir el crecimiento celular ya sea sembrando las células en el interior o aplicando un biomaterial que ayude a estimular dicho crecimiento.¹⁹

La creación de tales estructuras, deben cumplir ciertos requisitos, es decir, deben ser :

- Tridimensionales (3D): permite la formación de nuevo tejido y así vaya permitiendo su fijación en la estructura.
- Porosas e interconectados: para permitir el crecimiento de las células a través de la estructura, asegurando así el paso de los nutrientes para mantener vivas las células en ellas.
- Biocompatibles: entendido como la integración al organismo receptor sin que ello produzca efectos citotóxicos, genotóxicos o alguna respuesta inmune.
- Biodegradables: descomposición del material conjunto a la formación del hueso, a través de hidrólisis o termo-oxidación.^{4,20, 21}



RESPUESTA TISULAR EN RATAS *Wistar* A ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



La obtención de andamios permite entonces que estos templete tridimensionales actúen como una estructura de soporte que debe tener características y propiedades que le permitan biomimetizar el tejido que se pretende regenerar sobre sus bases y permitiendo que se dé la adhesión y su posterior proliferación y diferenciación celular.

2.3.1 Bioimpresión de andamios 3D

Uno de los métodos para la construcción en andamios es mediante la impresión 3D que fabrica un objeto tridimensional aplicando el diseño asistido por computadora construyéndolo capa por capa; la impresión comienza de la parte inferior para que, cada capa recién formada se active para adherirse a la capa anterior y poder construir estructuras complejas y así poder ser diseñadas por computadora (CAD), que la máquina usa como guías para imprimir. ²²

La impresión 3D permite una alta reproducción de la arquitectura y control de la microestructura del andamio, pudiendo diseñar estructuras de andamios capaces de imitar las complejas estructuras de la matriz extracelular (MEC). Para ser una opción viable, el material debe ser fácil de manipular por la tecnología de la impresora y reproducirlo en estructuras tridimensionales complejas, y proveer soporte estructural; pudiendo ser imprimibles con un alto grado de reproducción y manipulables para formar la morfología deseada de los andamios diseñados. ²²



2.4 POLIÁCIDO LÁCTICO

Para la elaboración de andamios existen diferentes materiales como los polímeros, de los cuales el más usado es el poliácido láctico (PLA). Este fue descubierto en 1780 por el químico sueco Scheele, quien lo aisló de leche agria; fue reconocido como producto de fermentación por Blondeaur en 1847 y tan solo en 1881, Littlelon inicia la fermentación a escala industrial.²³

Este es un biopolímero termoplástico cuya molécula precursora es el ácido láctico. El proceso de obtención del PLA puede ser por dos vías: química y biotecnológica. La producción biotecnológica se basa en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por microorganismos para así poder degradarse por distintos medios, generando básicamente dióxido de carbono, agua y humus, a una velocidad similar a la de los materiales orgánicos sencillos y no dejar residuos tóxicos ni visibles.^{24,25}

Debido a su biodegradabilidad, propiedades de barrera y biocompatibilidad, este biopolímero posee gran importancia en diversas áreas tanto biomédicas como en la industria alimenticia, del plástico, textil, la agricultura y alimentación animal.^{23,25}

En el área biomédica se utiliza en sistemas de liberación controlada de fármacos, dispositivos de fijación bioabsorbibles y de regeneración ósea, mientras; mientras que en la alimentaria como acidulante y preservante.²⁵



2.5 BIOCOMPATIBILIDAD

Al colocar un biomaterial para la terapéutica en tejido, uno de los principales criterios de calidad que debe poseer un biomaterial para ser elegido como sustituto óseo es una correcta biocompatibilidad con el tejido receptor, es decir, debe tener la capacidad de generar una respuesta biológica apropiada al ser aplicado en el tejido. ²⁶

A partir del desarrollo de los biomateriales, es posible definir cuatro fases, según la respuesta del organismo:

- Fase 1 Inerte: materiales implantables que generan poca o ninguna respuesta.
- Fase 2 Interactivo: materiales implantables que están diseñados para generar una respuesta específica y beneficiosa.
- Fase 3 Viable: materiales implantables, posiblemente con incorporación de células vivas, que son tratados por el organismo como tejido normal y son reabsorbidos o remodelados raras veces.
- Fase 4 Replante: materiales implantables consistentes de tejido nativo, desarrollado *in vitro* a partir de células previamente obtenidas del paciente. ²⁷

A la implantación de un biomaterial una de las respuestas a evaluar en la biocompatibilidad de los materiales es la cantidad de células presentes en la inflamación ya que esta es la primer reacción frente a la lesión, estas células presentes son:



RESPUESTA TISULAR EN RATAS *Wistar* A ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



- ▶ Neutrófilo: estas células comprenden el 40% al 75% de los leucocitos circulares en sangre y aumenta en las infecciones bacterianas y son primeras en llegar al foco inflamatorio. La función de esta célula en la inflamación es formar la primera línea de defensa del cuerpo ante una infección bacteriana. ^{28,29}
- ▶ Monocito: células maduras precursoras de los macrófagos, miden de 200 a 600 μm de diámetro, tiene un núcleo de morfología variable donde se pueden observar en forma ovoide, arriñonados y de herradura. Mediante moléculas de adhesión y factores quimiotácticos, estas células se desplazan hacia el sitio de la lesión entre 24 a 48 hrs posteriores al inicio de la inflamación. Al alcanzar los tejidos extravasculares, éstos se transforman y se convierten en células fagocitarias más grandes llamadas macrófagos. ²⁹
- ▶ Macrófagos: considerados el pilar fundamental de la inflamación crónica. Se encuentran en los tejidos y que proceden de los mastocitos, éstos poseen la capacidad de unirse a otros macrófagos. En condiciones normales, éstos se encuentran dispersos en el tejido, donde actúan como filtro ante bacterias y partículas. ²⁹
- ▶ Linfocitos: son células que se movilizan en la respuesta específica del sistema inmune, activándose con el objetivo de producir anticuerpos y células capaces de identificar y destruir el microbio patógeno. ³⁰

- ▶ Células plasmáticas: se diferencian a partir de los linfocitos B activados. Su función consiste en la producción de grandes cantidades de anticuerpos dirigidos contra el microorganismo causante, o en ocasiones contra antígenos endógenos en las enfermedades autoinmunes.^{29,30}
- ▶ Células gigantes: en la inflamación crónica, cuando los macrófagos no pueden eliminar a las partículas, se fusionan formando células gigantes multinucleadas. Uno de los tipos de estas células, son las células gigantes de cuerpo extraño. Estas contienen numerosos núcleos, de tamaño y forma uniforme y se encuentra dispersos por todo el citoplasma.³⁰ Figura 8.

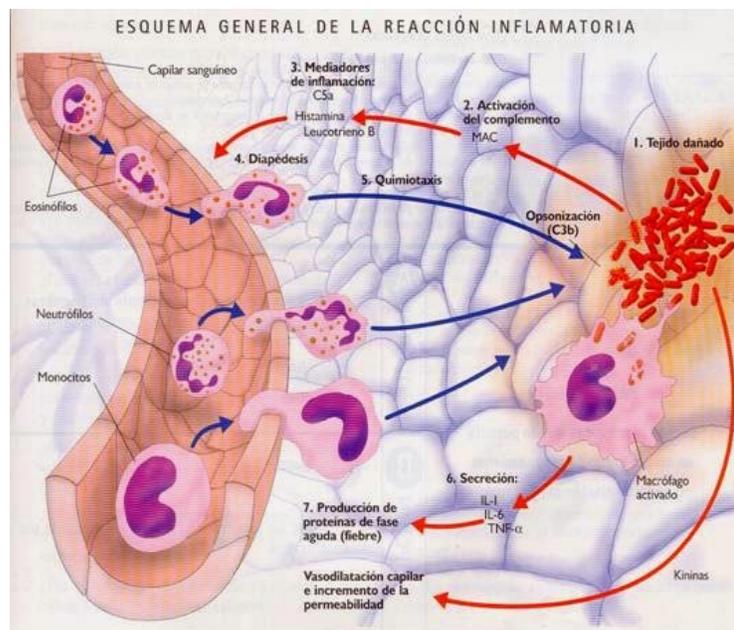


Figura 8 Representación de células en el proceso inflamatorio.³¹



RESPUESTA TISULAR EN RATAS *W1STAR* A ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



III. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

Las alternativas terapéuticas actuales en la regeneración de tejidos, no ha logrado al cien por ciento la regeneración de los tejidos dañados o perdidos; ya sea por patologías, malformaciones genéticas, traumatismos, tumores, etc. Por tal motivo, las investigaciones están encaminadas en realizar tratamientos personalizados que permitan realizar constructos con geometrías y tamaños a la medida de los defectos, permitiendo una adaptación en los bordes, así como la forma exacta del defecto. Esto se puede realizar mediante el diseño de andamios en 3D a partir de tomografías donde se pueda analizar el defecto y diseñarlo, esto con el objetivo de realizar la impresión del diseño en bioimpresoras de 3D. Estos diseños al ser personalizados garantizarían la regeneración completa del defecto y mejorar así la calidad de vida de los pacientes.

La bioimpresión personalizada de andamios permitirá obtener andamios con características prometedoras y únicas que permitan la adaptación a los bordes, que permita al organismo una inmediata aceptación de dichos andamios y se logre regenerar la zona dañada con una óptima función en menor tiempo.

Para lograr dicho objetivo, es indispensable realizar estudios de manera *in vitro* e *in vivo* donde se pueda dilucidar la biocompatibilidad del material para continuar con las investigaciones hasta lograr realizar medicina traslacional.



RESPUESTA TISULAR EN RATAS *Wistar* A ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



IV. HIPÓTESIS

Los andamios impresos de PLA son biocompatibles al estar en contacto con tejido celular subcutáneo de ratas *Wistar*.



RESPUESTA TISULAR EN RATAS *Wistar* A ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta tisular en tejido celular subcutáneo de ratas *Wistar*, posterior a la implantación de andamios de poliácido láctico impresos en 3D.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la respuesta tisular, posterior a la implantación de andamios impresos de poliácido láctico a diferentes tiempos (4, 10 y 21 días).

Describir y cuantificar las células adyacentes al andamio.

Determinar si los andamios de PLA impresos en 3D son biocompatibles.



RESPUESTA TISULAR EN RATAS *WISTAR* A ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



VI. METODOLOGÍA

6.1 MATERIALES

Los materiales empleados en este trabajo fueron financiados por el proyecto DGAPA-UNAM-PAPIIT IA205818.

Equipo	Insumos	Recursos Humanos	Recursos Animales	Recursos Financieros	Infraestructura	
Esterilizador Sterrad	Guantes	Mango de bisturí #3	Bianca Montserrat Azpeitia Sánchez	15 ratas macho cepa <i>Wistar</i>	DGAPA-UNAM-PAPIT IA205818 Responsable Dra. Janeth Serrano Bello.	Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos DEPeI, UNAM.
Histoquinete	Cubrebocas	Hojas de bisturí 15	Dra. Janeth Serrano Bello (Directora)			Laboratorio de Patología DEPeI, UNAM.
Microtomo	Batas	Porta agujas	Dra. Patricia González Alba (Asesora)			Bioterio de la Facultad de Odontología DEPeI, UNAM.
Microscopio óptico	Lentes	Pinzas Kelly curvas y rectas	C. Juan Trejo (Responsable del bioterio)			Instituto Nacional de Cancerología
Bioimpresora 3D modular marca MakerMex® modelo MM1	Alimento estándar para 15roedor (rodent diet 5001)	Pinzas de curación				
	Toallas desinfectantes	Tijeras Iris rectas				
	Campos	Tijeras para sutura				
	Bebederos	Sutura Vicryl 3-0				
	Aserrín	Formol al 10%				
	Jabón quirúrgico	Frascos contenedores para muestra				
	Ketamina (80 mg/Kg)	Portaobjetos y cubreobjetos				
	Xilacina (10mg/kg)	Colorantes de Hematoxilina y Eosina				
	Jeringas de 1 ml	Resina para sellar cubreobjetos				
	Rasuradora	Polímero sintético, Políácido Láctico (PLA)				
	Yodopavidona	Gasas				

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



6.2 MÉTODO

Los andamios utilizados para el presente trabajo fueron previamente impresos por la técnica aditiva de capa por capa en 3D utilizando el PLA como material extrusor a una temperatura de 180°.

- **Esterilización por plasma (H₂O₂) de los andamios 3D**

Las muestras utilizadas se empaquetaron en bolsas de polipropileno de alta densidad (bolsas Tyvek®), se metieron y se esterilizaron en un equipo STERRAD® en el Instituto Nacional de Cancerología para lograr su completa esterilización.

- **Modelo animal**

Se utilizaron 15 ratas *Wistar*, machos, jóvenes adultas de 250g de peso, las cuales fueron albergadas en el bioterio de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) de la Facultad de Odontología de la UNAM.

El alimento que se les administró fue rodent diet 5001 para roedores de laboratorio y agua, ambos ad libitum.

- **Procedimiento quirúrgico**

Las ratas fueron sedadas con Ketamina (80 mg/kg) y Xilocaína (10mg/kg), ambas por vía intramuscular, posteriormente se rasura el lomo de la rata y se pone sobre la mesa de mayo encima de un campo estéril para comenzar la cirugía. Se coloca sobre la piel de la rata yodopovidona para crear un área de

trabajo antiséptica, a continuación, del lado superior derecho se realiza una incisión de primera intención sobre la piel del animal aproximadamente de 2cm hasta llegar a tejido subcutáneo, con ayuda de las pinzas de mosco se separa el tejido obteniendo un colgajo tipo sobre, donde posteriormente se introdujo el andamio de PLA lo más alejado del sitio quirúrgico para no interferir con el proceso de cicatrización. Finalmente se afronta el colgajo suturando con Vicryl 3-0 mediante puntos simples (Figura 9) Fuente directa.



Figura 9. Procedimiento quirúrgico. A) Muestra de Andamio PLA impreso en 3D. B) incisión lineal sobre lomo de rata *Wistar*. C) Colgajo tipo sobre donde se colocará la muestra. D) colocación de muestra de PLA en tejido subcutáneo. E) inserción de la muestra de PLA en tejido subcutáneo. F) Reposición y sutura del tejido.



RESPUESTA TISULAR EN RATAS *Wistar* A ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



- **Sacrificio de los animales y procesamiento histológico.**

Al finalizar los tiempos establecidos para el estudio (4, 10 y 21 días), los animales se sacrificaron por sobredosis de cloroformo produciendo paro cardiorrespiratorio. Se realizó una biopsia excisional de la zona donde se encontraba el andamio, teniendo un margen de seguridad de 2 mm, seguidamente las muestras se introdujeron en formol al 10% durante 24 horas para su fijación, posteriormente las muestras se procesaron de manera histológica por medio de un histokinette, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes seriados de 5 μm de grosor y se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E) para su observación en microscopía óptica.

- **Evaluación histológica.**

Se observaron cada una de las laminillas, con ayuda de un microscopio óptico Amscope a diferentes objetivos (10x, 20x y 40x) donde se observó la respuesta inflamatoria, se cuantificaron las células gigantes de cuerpo extraño por 4 áreas por campo y se midió el grosor de la cápsula en un objetivo de 40x con una cámara digital Amscope Fma075 acoplada a microscopio.

VII. RESULTADOS

- **Respuesta histológica a los 4 días**

En las muestras histológicas obtenidas a los 4 días posteriores a la colocación del andamio, se observó un fragmento de tejido blando, donde se identifica una cavidad rodeada por una cápsula de tejido conectivo laxo con material fibrilar, infiltrado inflamatorio compuesto por células plasmáticas, macrófagos, leucocitos, vasos sanguíneos de pequeño y gran calibre siendo este último de aproximadamente 35 μm , los cuales están congestionados y con esclerosis (figura 10). Además, se observaron células gigantes de tipo cuerpo extraño (figura 11), así como formación de una cápsula alrededor del andamio, cabe considerar que en la muestra existe un grosor mínimo y máximo. (figura 12 y 13).

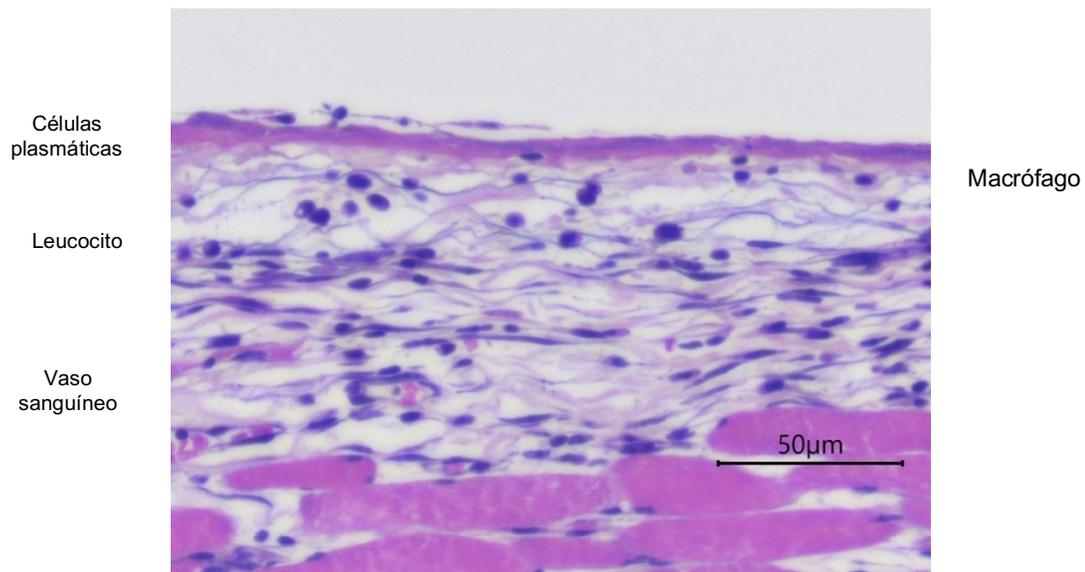


Figura 10 Fotomicrografía de un corte histológico teñido con H&E a 40x, donde se observan células de infiltrado inflamatorio.

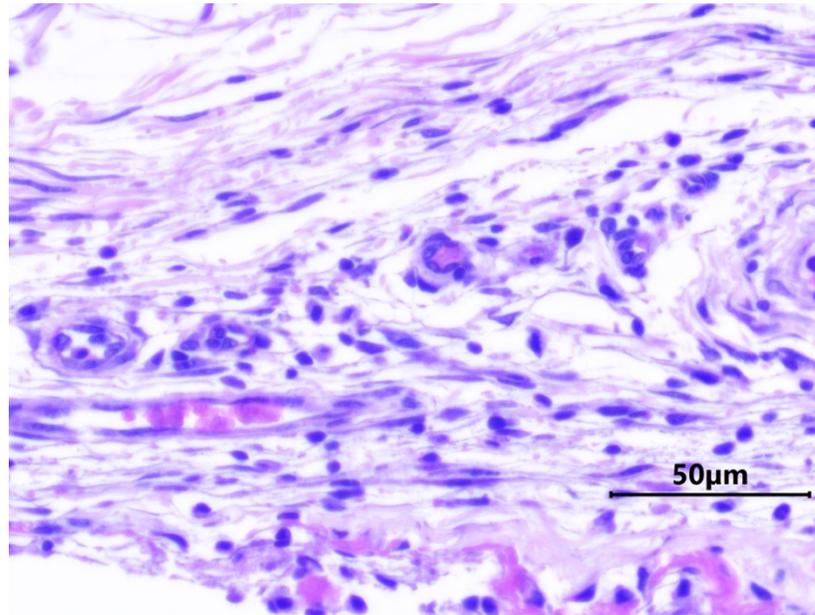


Figura 11 Fotomicrografía de un corte histológico teñido con H&E a 40x. Se observan células gigantes de tipo cuerpo extraño (flecha).

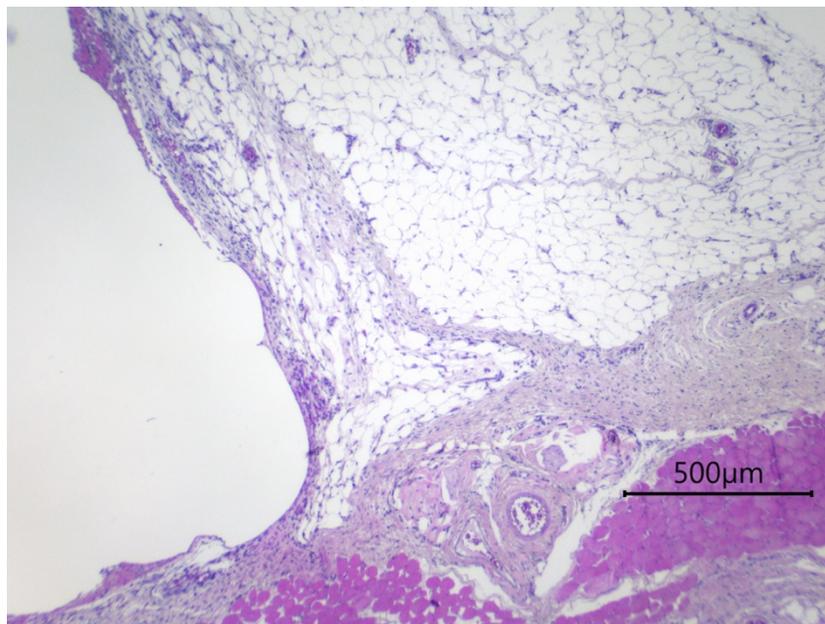


Figura 12 Fotomicrografía teñida con H&E a 40x, de muestra histológica donde La flecha indica el grosor mínimo de la cápsula.

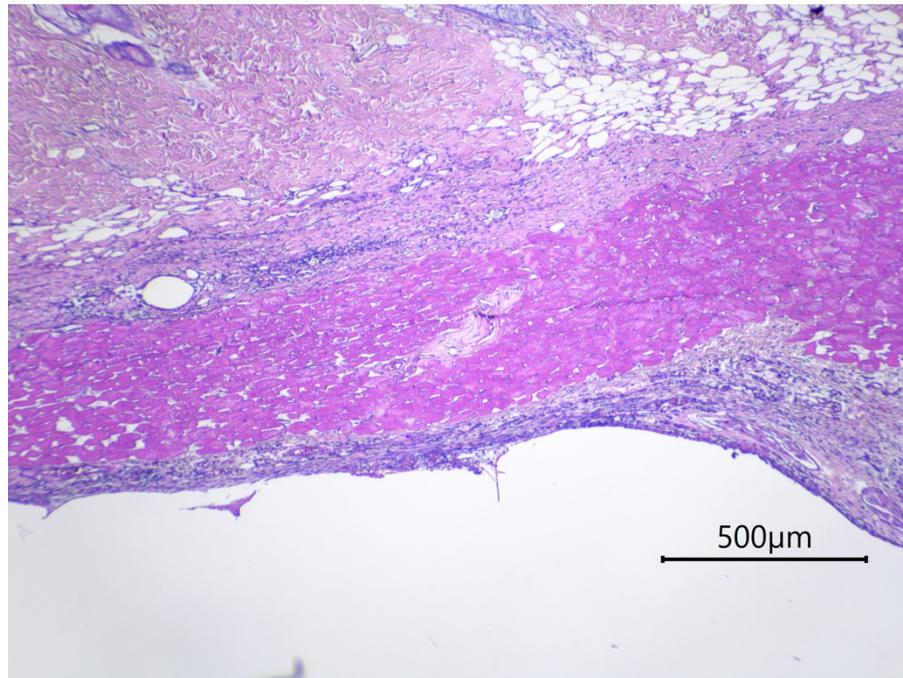


Figura 13 Fotomicrografía de muestra histológica teñida con H&E a 40x, la flecha indica el grosor máximo de la cápsula.

- **Respuesta histológica a los 10 días**

La respuesta tisular a los 10 días, mostró un fragmento de tejido blando, donde se observa una cavidad rodeada por una cápsula de tejido conectivo laxo, infiltrado inflamatorio compuesto por células plasmáticas, polimorfonucleares, macrófagos xantomatosos, leucocitos, fibroblastos, vasos sanguíneos de pequeño y grande calibre congestionados con esclerosis y un área de necrosis focal (figura 14), también se pueden observar escasas células gigantes de tipo cuerpo extraño y la formación de una cápsula alrededor del andamio, teniendo un grosor mínimo y un máximo (figura 15 y 16).

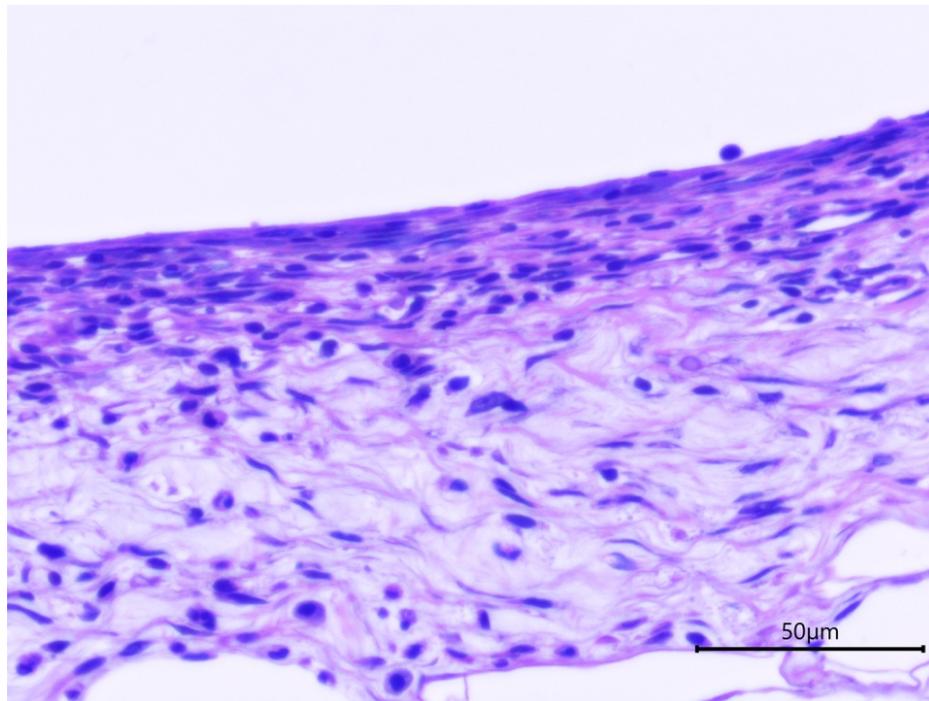


Figura 14 Fotomicrografía de muestra histológica teñida con H&E se observan células de infiltrado inflamatorio con un acercamiento de 40x.

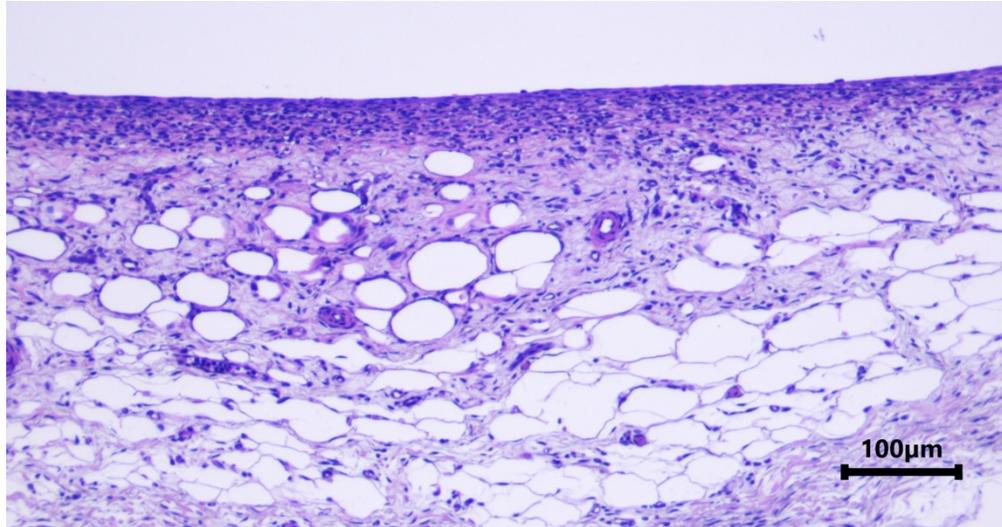


Figura 15 Fotomicrografía de muestra histológica teñida con H&E a 10x, la flecha indica el grosor mínimo de la cápsula.

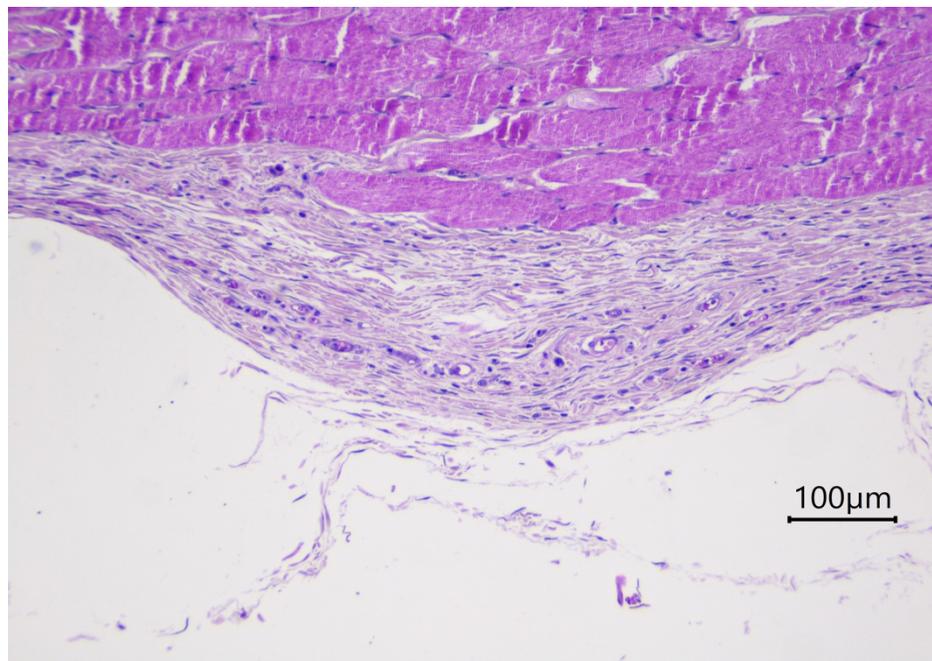


Figura 16 Fotomicrografía de muestra histológica teñida con H&E a 10x, la flecha indica el grosor máximo de la cápsula.

- **Respuesta histológica a los 21 días**

En las muestras obtenidas a los 21 días se observa un fragmento de tejido blando con presencia de una cavidad de tejido conectivo subyacente a los estratos de la piel, con una cápsula compuesta de tejido conectivo laxo, formado por fibras de colágena densa, fibroblastos pequeños y estrellados, vasos de pequeño y grande calibre congestionados, algunos esclerosados y células inflamatorias escasas. La cápsula se observa friable y con área de necrosis (figura 17 y 18).

Se observan células gigantes de tipo cuerpo extraño (figura 19) y formación de una capsula alrededor de andamio, en la figura 20 y 21 se observa el grosor mínimo y máximo de la cápsula respectivamente.

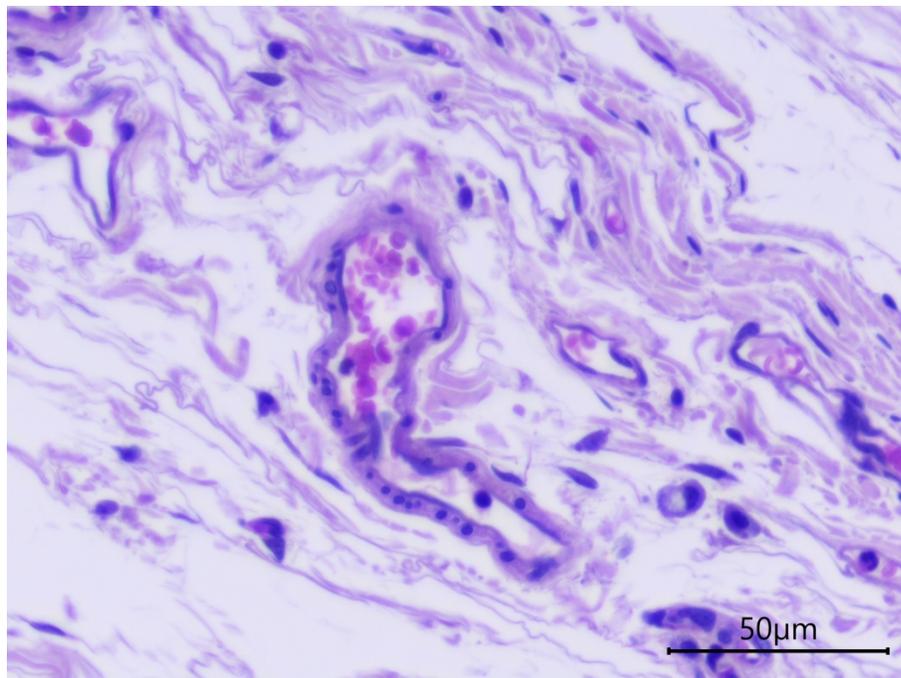


Figura 17 Fotomicrografía de un corte histológico teñido con H&E a 40x donde se observan vasos de gran calibre escleróticos (flechas).

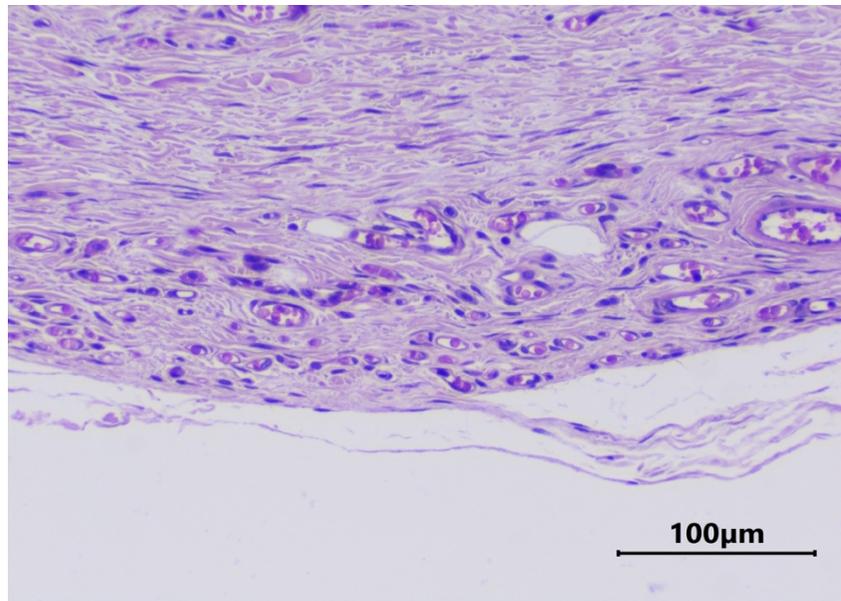


Figura 18 Fotomicrografía de un corte histológico teñido con H&E a 20x, se observan vasos de grande y pequeño calibre (flechas rojas) con una cápsula friable (flecha naranja).

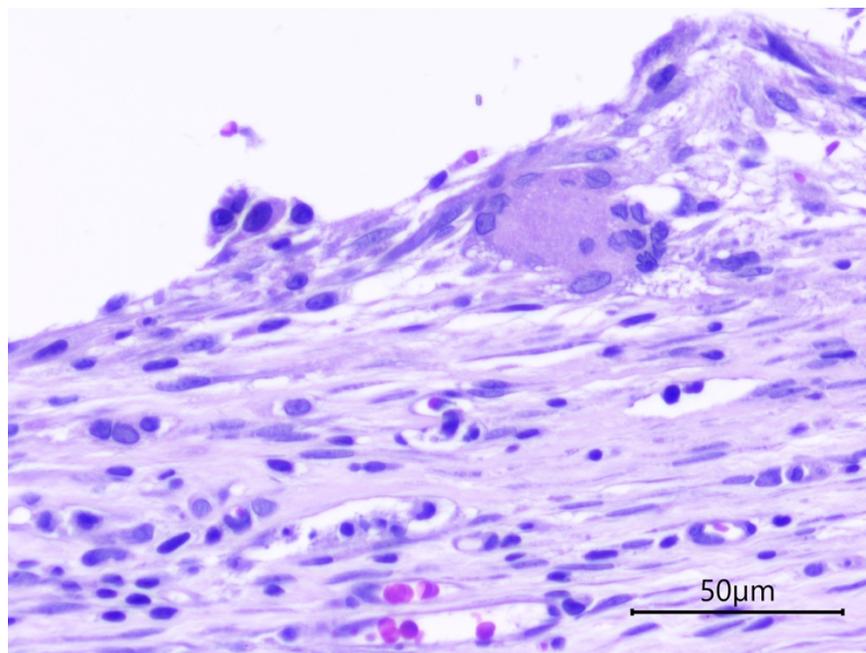


Figura 19 Fotomicrografía de un corte histológico teñido con H&E a 40x, la flecha indica la formación de una célula gigante de tipo cuerpo extraño.

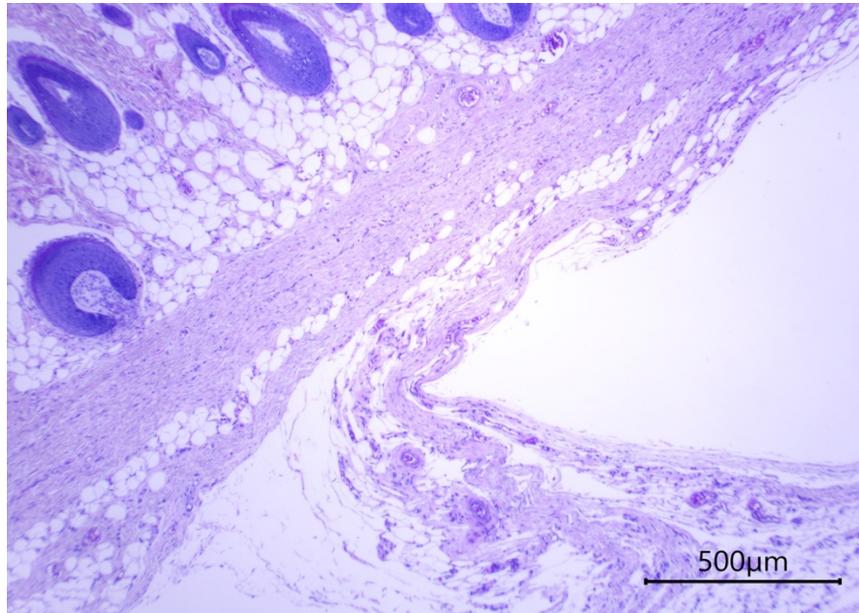


Figura 20 Fotomicrografía de un corte histológico teñido con H&E a 40x, la flecha indica el grosor mínimo de la cápsula.

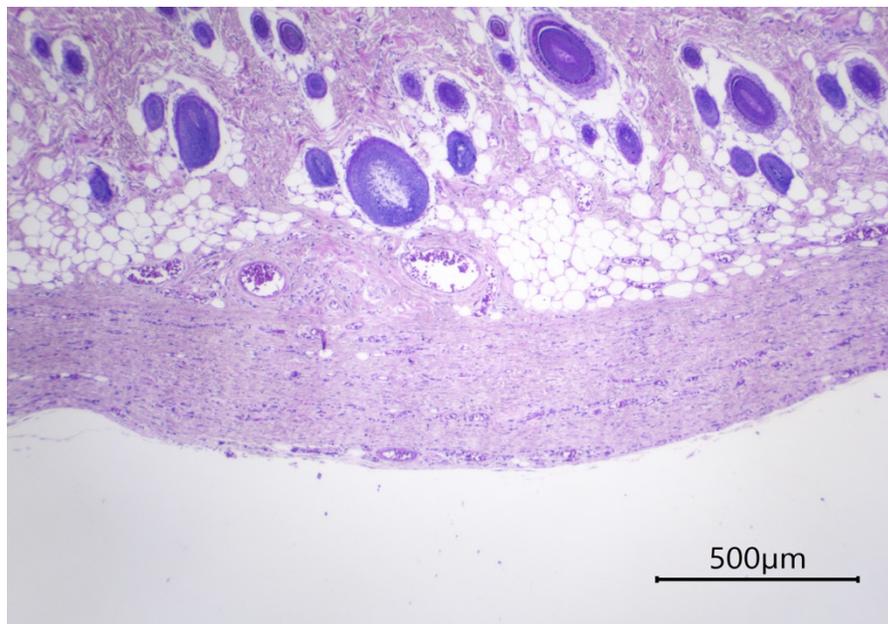


Figura 21 Fotomicrografía de un corte histológico teñido con H&E a 40x, la flecha indica el grosor máximo de la cápsula.



VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizaron conteos de dos parámetros importantes, por un lado se contaron las células gigantes de tipo cuerpo extraño en los diferentes periodos de tiempo, de igual manera se midió el grosor mínimo y máximo de la cápsula que se formó alrededor del andamio de PLA, los resultados demostraron que a los 4 días el promedio de células gigantes de cuerpo extraño fue de 4.75 ± 1.12 , los cuales disminuyeron considerablemente a los 10 días ya que en promedio se observaron solo $0.05 \text{ células} \pm 0.05$, finalmente a los 21 días se contaron en promedio $1.25 \text{ células} \pm 0.28$. El único grupo con diferencia estadística significativa fue el de los 4 días con un valor de $p=0.0004$ en comparación con los grupos de 10 y 21 días.

En la figura 20 se observa de manera gráfica los promedios con respecto a las células gigantes de tipo cuerpo extraño comparadas por periodo de tiempo.

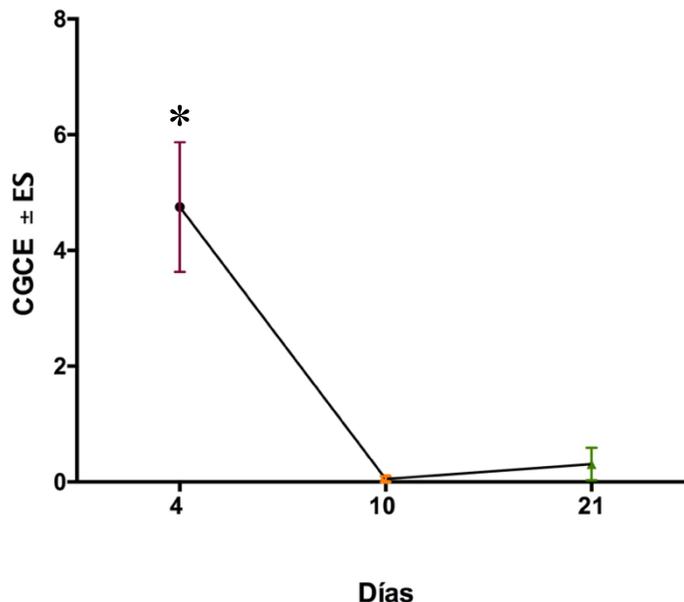


Figura 20 Gráfica del promedio de conteo de células de cuerpo extraño por día, a los 4 días es donde se observa la mayor presencia de dichas células.



RESPUESTA TISULAR EN RATAS Wistar A ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



Con respecto al grosor mínimo y máximo de la cápsula que se formó alrededor del andamio, a los 4 días el grosor mínimo fue de $63.63 \mu\text{m} \pm 21.88$ y el máximo fue de $192.016 \mu\text{m} \pm 77.23$. Mientras que a los 10 días se observó un grosor mínimo de $37.43 \mu\text{m} \pm 3.99$ y un máximo de $115.96 \mu\text{m} \pm 18.42$; en contraste, a los 21 días, con el grosor mínimo fue de $87.64 \mu\text{m} \pm 31.34$ y el máximo fue de $364.06 \mu\text{m} \pm 73.35$.

Los grupos que presentaron diferencia estadísticamente significativa, fueron los correspondientes al grosor máximo a los 4 días en comparación con los 21, con un valor de $p < 0.05$.

En la figura 21 se observa de manera gráfica los promedios con respecto al grosor mínimo y máximo de la cápsula por día.

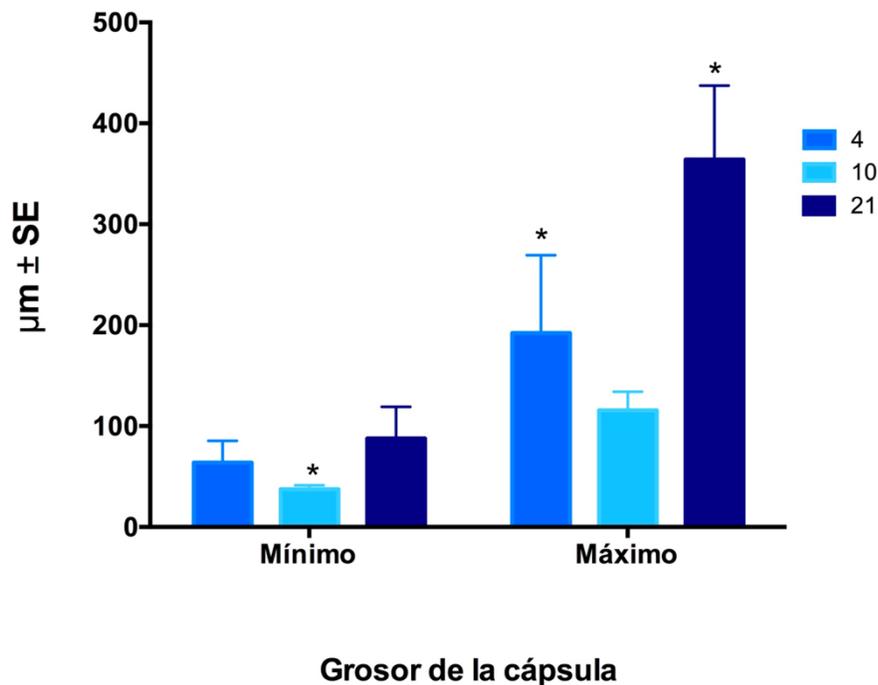


Figura 21 Promedio del grosor mínimo y máximo de la cápsula respecto al día los * indican los grupos donde hay diferencia estadística.



IX. DISCUSIÓN

La ingeniería de tejidos está en constante avance en la investigación y en la realización de biomateriales que cumplan con las características de biodegradación, biocompatibilidad y osteconductividad, para poder desarrollar una estructura que pueda ejercer la función de un andamio, permitiendo el crecimiento, la adhesión, proliferación y diferenciación celular, así como que dicho andamio actúen como matriz extracelular, permitiendo la regeneración de defectos óseos de tamaño crítico.⁵

En el proyecto realizado, se implantó en tejido subcutáneo de ratas *Wistar*, andamios impresos por la técnica aditiva de capa por capa, obteniendo un andamio en 3D utilizando el PLA como material extrusor, con el objetivo de evaluar la biocompatibilidad mediante la presencia de células encontradas en el infiltrado inflamatorio producido en diferentes tiempos (4, 10 y 21 días).

Es importante mencionar que para la realización de estos andamios, se basa en la producción por impresión en 3D que tiene la capacidad de obtener un andamio con la dimensión, grosor, tamaño y porosidad requeridos para cada defecto a tratar.

Los resultados demostraron que hay presencia de tejido conectivo, vasos sanguíneos y algunas células presentes en el infiltrado inflamatorio, lo cual concuerda con los estudios realizados por Bustamante y cols.³²

Mike Barbeck observó a la evaluación de la respuesta tisular posterior a la implantación vascularización y la presencia de neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y células gigantes multinucleadas asociadas con



RESPUESTA TISULAR EN RATAS Wistar A ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



biomateriales.³³ Es importante mencionar que en nuestro estudio se contaron las células gigantes de cuerpo extraño y se demostró que con el paso del tiempo dichas células disminuyeron, siendo el pico máximo a los 4 días, lo que nos indica que el material tiene un comportamiento biológico de compatibilidad con el tejido. La presencia de células de cuerpo extraño se atribuye a la actividad fagocítica que conlleva la hidrólisis del polímero, así también como los macrófagos que se presentan en los primeros días posteriores a la implantación.

Un punto importante a contrastar es el tamaño de la cápsula fibrosa, la cual con respecto al tiempo en algunas zonas de la muestra va aumentando. Biligzaya Dorj, en un estudio similar, menciona la respuesta celular que se presentó alrededor del andamio, donde hubo presencia de una capa gruesa de tejido fibroso que rodeaba al andamio, así como un gran número de fibroblastos que se han observado normalmente en los andamios de biopolímeros y la formación de vasos sanguíneos de calibres diferentes.³⁴

Cabe señalar que el estudio se observó hasta los 21 días, por tal motivo sería necesario realizar evaluaciones a más periodos de tiempo para poder comparar si el engrosamiento es continuo o se va eliminando la cápsula, esto debido a la variación del tamaño, ya que no es homogénea. Sin embargo, la evaluación hasta los 21 días nos permitió observar que los andamios impresos en 3D con PLA son biocompatibles en tejido subcutáneo de rata.



RESPUESTA TISULAR EN RATAS Wistar A ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



X. CONCLUSIONES

Con base a los resultados se concluye que los andamios impresos en 3D con poliácido láctico, son biocompatibles, ya que las células encontradas adyacentes al material, fueron las células que participan en el proceso inflamatorio, mientras que las células gigantes de cuerpo extraño, solo tuvieron valor significativo al inicio de la colocación del andamio, siendo una respuesta considerada normal por el organismo, ya que se trata de un material ajeno al cuerpo de la rata.

Finalmente, los andamios de PLA se pueden considerar biocompatibles, con un gran potencial para utilizarlos en nuevos experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*, en bioingeniería de tejidos.



XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Joseph d. Brozino, PhD P. *INTRODUCTION TO BIOMEDICAL ENGINEERING*. OXFORD: ELSEVIER; 2012.
2. Ochoa S, Aguilar N, Méndez A. Investigación y Ciencia. *Ing tejidos Una nueva Discip en Med Regen*. 2012;64:61-69.
<http://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/numero/429/el-futuro-de-la-energa-elica-8652>.
3. Colorado AC, Agudelo CA, Moncada ME. Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel: revisión (Analysis of biomaterials for skin tissue engineering: review /Análise de biomateriais para uso em engenharia de tecidos da pele: patch). *Rev Ing Biomédica*. 2014;7(14):11-23.
<http://repository.eia.edu.co/revistas/index.php/BME/article/view/466>.
4. Scheller EL, Krebsbach PH, Kohn DH. Tissue engineering: State of the art in oral rehabilitation. *J Oral Rehabil*. 2009;36(5):368-389.
doi:10.1111/j.1365-2842.2009.01939.x
5. Ali A, Valencia A, Phd NVB, et al. Biocompatibilidad de andamios nanofibrilares con diferentes concentraciones de PLA / Hidroxiapatita Biocompatibility of Nanofibrous Scaffolds with Different Concentrations of PLA / Hydroxyapatite. 2016;(18):51-62.
6. Lindhe, J., Lang, N., Martínez, H., Karring, T., Addy, M., Albrektsson, T. and Attström R. *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica*. Madrid, España: Médica Panamericana; 2017.
7. Fermin A. Carranza, Jane L. Forrest, E. Barrie Kenney MGN. *Periodontología. Clínica de Carranza*. 11th ed. New York, USA:



RESPUESTA TISULAR EN RATAS W1STAR A ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



McGraw-HILL Interamericana; 2014.

8. Papapanou PN, Tonetti MS. Diagnosis and epidemiology of periodontal osseous lesions. *Periodontol 2000*. 2000;22(1):8-21.
doi:10.1034/j.1600-0757.2000.2220102.x
9. María Cristina Ikeda Artacho, Gustavo Mori Arambulo. Defectos de furcación. Etiología, diagnóstico y tratamiento. *Rev Estomatol Hered*. 2010;20(3):172-178.
<http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/viewFile/2367/2325>.
10. Trujillo DM, Isabel ID, Brito M, René II. Injertos óseos en implantología oral Bone grafts in oral implantology. *Rev Medica Electron*. 2014;36(4):449-461.
11. Gonzalez E, Lugo J carlos, Fandiño LA. Rehabilitación protésica y regeneración ósea guiada en defectos de tipo horizontal. *Rev Mex Periodontol*. 2014;5(2):71-74.
<http://www.medigraphic.com/pdfs/periodontologia/mp-2014/mp142f.pdf>.
12. Peña-brambila FJ De, Miranda-díaz AG. Alternativas de reconstrucción de los defectos óseos mandibulares. 2016;12:99-106.
13. Barcelona D. Injertos óseos en implantología.
<https://www.dentisalut.com/injertos-oseos-en-implantologia/>.
14. Silueta de un grupo de amigos [Internet]. Freepik. 2018 [cited 10 October 2018]. Available from: https://www.freepik.es/vector-gratis/silueta-de-un-grupo-de-amigos_1164909.htm.
15. Aloinjertos » Dental Quirurgic'S [Internet]. Dentalquirurgics.com. 2018 [cited 10 October 2018]. Available from:
http://www.dentalquirurgics.com/categoria_aloinjertos-151.aspx#b.:c:151,page:1.



RESPUESTA TISULAR EN RATAS *Wistar* A
ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



16. Parra S. El esqueleto humano en cifras [Internet]. Xatakaciencia.com. 2018 [cited 10 October 2018]. Available from:
<https://www.xatakaciencia.com/biologia/el-esqueleto-humano-en-cifras>.
17. Injerto óseo de origen bovino [Internet]. Matcom México. 2018 [cited 8 October 2018]. Available from:
<https://www.matcom.com.mx/productos/regeneracion-osea/injerto-oseo-de-origen-bovino.html>.
18. Tortolini P, Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos. *Av en Periodoncia e Implantol Oral*. 2012;24(3):133-138.
19. Vega DS. Acta bioclínica. *Acta Bioclínica*. 2012;2(3):94-121.
<http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/actabioclinica/article/view/3975>.
20. Marcos Sabino, Loaiza Marielys, Dernowsek Janaína, Rezende Rodrigo JDS. Técnicas Para La Fabricación De Andamios Poliméricos Con Aplicaciones En Ingeniería De Tejidos. *Rev Lat Met*. 2017;37(2):120-146.
21. Guo C, Zhou L, Lv J. Effects of expandable graphite and modified ammonium polyphosphate on the flame-retardant and mechanical properties of wood flour-polypropylene composites. *Polym Polym Compos*. 2013;21(7):449-456. doi:10.1002/app
22. Adragna C, Jurczyszyn S, Comín R, Nocera AD, Salvatierra NA, Cid MP. Collagen obtaining for 3D printing to create biological substitutes for biomedical applications. 2018;22(1):24-32.
23. Serna-Cock L, Rodríguez-de Stouvenel A. Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte. *Cienc y Tecnol Aliment*. 2005;5(1):54-65. doi:10.1080/11358120509487672
24. Serna C. L, Rodríguez de S. A, Albán A. F. Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones. *Rev Ing y Compet*. 2011;5(1):16-26.



RESPUESTA TISULAR EN RATAS W1STAR A ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



doi:0123-3033

25. Jiménez-Bonilla P, Sibaja Ballester M, Vega–Baudrit J. Síntesis y caracterización de poli (ácido láctico) por policondensación directa, obtenido del fermento de desechos agroindustriales de banano (musa acuminata aaa variedad Cavendish cultivar (gran naine) en Costa Rica. *Rev Iberoam Polímeros*. 2012;13(2):52-59.
26. Voegeli AV. *Lecciones Básicas de Biomateriales Del Aparato Locomotor*. Barcelona: MASSON; 2004.
27. Behrndt H. LA. Estudio de la biocompatibilidad 6.1. *Mater Sci Eng*. 2011:120-133.
28. Petrelli BG, Guillén, Flores J VF. El neutrófilo y su importancia en la enfermedad periodontal. *Av Periodon Implant*. 2005;17(1):11-16.
29. Elba Rosa Leyva Huerta LAGC. *Patología General E Inmunología*. MÉXICO: TRILLAS; 2008.
30. trayer D, Rubin E RRR y S. *Patología: Fundamentos Clinicopatológicos En Medicina 6th Ed*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
31. BiologíaSur - Mecanismos de defensa [Internet]. Biologiasur.org. 2018 [cited 8 October 2018]. Available from: <https://www.biologiasur.org/index.php/inmunologia/mecanismos-de-defensa>.
32. Sebastian J, Valencia C, Zuluaga F. *IMPLANTOLOGIA*. 2012;(August 2016).
33. Barbeck M, Serra T, Booms P, et al. Analysis of the in vitro degradation and the in vivo tissue response to bi-layered 3D-printed scaffolds combining PLA and biphasic PLA/bioglass components – Guidance of the inflammatory response as basis for osteochondral regeneration. *Bioact Mater*. 2017;2(4):208-223. doi:10.1016/j.bioactmat.2017.06.001



RESPUESTA TISULAR EN RATAS Wistar A
ANDAMIOS DE PLA IMPRESOS EN 3D.



34. Dorj B, Won JE, Kim JH, Choi SJ, Shin US, Kim HW. Robocasting nanocomposite scaffolds of poly(caprolactone)/hydroxyapatite incorporating modified carbon nanotubes for hard tissue reconstruction. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2013;101 A(6):1670-1681. doi:10.1002/jbm.a.34470