



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS POROSOS DE PCL  
PARA LA REGENERACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

PRESENTA  
Maria Fernanda Ramirez Ruiz

TUTORA  
Dra. Janeth Serrano Bello  
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Ciudad de México

Diciembre 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos**

Quisiera dedicar esta etapa de mi formación académica a mis padres María Teresa Ruiz y Luis Fernando Ramírez por todo el apoyo brindado durante mis estudios.

A mi mascota Sandy por todo el amor y cariño incondicional brindado durante casi 18 años.

A mi abuela Irma Ruiz Negrete por siempre sacarme una sonrisa y confiar en mis aptitudes y habilidades.

A mis amigos que estuvieron durante esta etapa ayudando para que fuera más sencilla.

A mis familiares fallecidos por Covid-19 porque gracias a ellos aprendí el verdadero significado de resiliencia, compromiso y responsabilidad en días difíciles.

A la Dra. Janeth Serrano Bello por ser una gran persona y tutora, gracias por siempre tener tiempo para mi durante estos dos años, por estar ahí en momentos difíciles y sobre todo por su dedicación y pasión en esta área de la odontología.

A todos mis compañeros y profesores del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos que me apoyaron durante estos dos años de Maestría.

A todos los profesores de la Maestría en Ciencias Odontológicas por transmitir su conocimiento para poder tener nuevas herramientas y poder continuar en este camino.

Al proyecto **DGAPA-UNAM-PAPIIT-IN221020** por el financiamiento para este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de haber realizado mis estudios de posgrado.

Al CONACYT por el apoyo brindado durante estos 24 meses.

## Índice

Resumen.....	4
Abstract.....	5
Introducción.....	6
I.- Marco Teórico.....	7
1.1 Tejido óseo.....	7
1.2 Defectos maxilofaciales .....	15
1.3 Regeneración del tejido óseo.....	17
1.4 Tratamientos.....	19
II.- Antecedentes.....	32
2.1 Ingeniería de tejidos.....	32
2.2 Andamios para regeneración ósea.....	34
2.3 Técnicas para la fabricación de andamios para regeneración ósea.....	35
3.- Biopolímeros.....	41
3.1 Poli ( $\epsilon$ - caprolactona) (PCL).....	42
III.- Justificación.....	44
IV.- Planteamiento del problema.....	45
V.- Hipótesis.....	45
VI.- Objetivos.....	46
VII.- Metodología y diseño.....	46
VIII.- Resultados.....	50
IX.- Discusión.....	64
X.- Conclusiones.....	69
XI.- Referencias.....	70

## Resumen

El campo de la ingeniería de tejidos (IT) integra diversas áreas con la intención de generar y reparar órganos y/o tejidos, a través de biomateriales que permitan la recuperación completa de su función. Diversos factores etiológicos generan daño óseo, por ejemplo, las malformaciones óseas, la reabsorción ósea asociada a tumores, la enfermedad periodontal y los traumatismos. Entre las estrategias empleadas para tratar el problema de daño y pérdida del tejido óseo se encuentran los injertos (autoinjertos, xenoinjertos, aloinjertos, isoinjertos, injertos aloplásticos), los autoinjertos son los más utilizados pero requieren múltiples cirugías y la disponibilidad del tejido es limitada. Por estas razones, la ingeniería de tejidos es una nueva alternativa potencial. En el área odontológica, los defectos óseos van desde recesiones milimétricas hasta la resección completa de la mandíbula, las cuales suelen tratarse, con hueso liofilizado, membranas o prótesis metálicas, devolviendo la función de manera limitada.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue diseñar, fabricar y caracterizar andamios de policaprolactona (PCL) porosos por medio de la técnica de lixiviación de partículas y fundición de disolventes, lo cual permite generar una porosidad adecuada entre 100-325  $\mu\text{m}$  y una mayor interconectividad entre los poros. El presente trabajo propone la fabricación de una estructura de andamiaje semejante a la de la matriz extracelular ósea lo cual promoverá la adhesión, proliferación, diferenciación y migración celular para regenerar de manera eficaz, tejido de *novo*, similar al hueso nativo. Logramos sintetizar diversos andamios de PCL bajo diferentes condiciones y obteniendo andamios con una rugosidad homogénea en toda la superficie, además, se obtuvo un tamaño de poro heterogéneo, de un tamaño de 100-150  $\mu\text{m}$  y de 250-450  $\mu\text{m}$ , lo cual representa un tamaño de poro óptimo para la regeneración de tejido óseo.

## **Abstract**

The field of tissue engineering (TE) integrates various areas with the intention of generating and repairing organs and / or tissues, through biomaterials that allow the complete recovery of their function. Various etiological factors cause bone damage, for example, bone malformations, bone resorption associated with tumors, periodontal disease, and trauma. Among the strategies used to treat damage problem and bone loss are grafts (autografts, xenografts, allografts, isografts, alloplastic grafts), autografts are the most used but they require multiple surgeries and tissue availability is limited. For these reasons, tissue engineering is a new potential alternative. In the dental area, bone defects range from millimeter recessions to complete resection of the jaw, which are usually treated with lyophilized bone, membranes or metal prostheses, returning function in a limited way.

Therefore, the objective of this research was to design, manufacture and characterize porous polycaprolactone (PCL) scaffolds through solvent casting particle leaching technique which allows to generate an adequate porosity and greater interconnectivity between pores. This work proposes the manufacture of a scaffold with the structure similar to the bone extracellular matrix, which will promote cell adhesion, proliferation, differentiation and migration to efficiently regenerate tissue de novo, similar to native bone. We were able to synthesize various PCL scaffolds under different conditions and obtaining scaffolds with a homogeneous roughness over the entire surface, in addition, a heterogeneous pore size was obtained, with a size of 100-150  $\mu\text{m}$  and 250-450  $\mu\text{m}$ , which represents an optimal pore size for bone tissue regeneration.

## Introducción

La ingeniería de tejidos es un método alternativo para la regeneración de tejidos y órganos; así como la restauración de la función a través de implantar células y/o biomoléculas dentro de un andamio o una matriz. Existen diversos factores etiológicos involucrados en la pérdida o daño óseo que incluyen la enfermedad periodontal, lesiones traumáticas, reabsorción ósea asociada a tumores, entre otros. El tejido óseo posee la capacidad de remodelarse y regenerarse espontáneamente, sin embargo, dicha capacidad no se extiende en defectos de tamaño considerados críticos, por lo tanto, durante muchos años los injertos han sido utilizados como la base para el reemplazo, sin embargo presentan limitaciones. Los más utilizados como los autoinjertos requieren de múltiples cirugías, además la disponibilidad del tejido es limitada, por consiguiente, la reconstrucción de defectos constituye un gran desafío.

Por estas razones la ingeniería de tejidos se ha convertido en una terapia potencial, ya que, es un campo relativamente nuevo y multidisciplinario cuyo objetivo principal es restaurar y mejorar la función de los tejidos perdidos o dañados mediante la preparación de andamios tridimensionales (3D), sembrarlos con células y/o con factores de crecimiento.

Es por eso que la ingeniería de tejidos, sigue investigando nuevas alternativas para estos tratamientos, uno de ellos es la fabricación de andamios porosos 3D de PCL, la cual es un polímero sintético, semicristalino, biodegradable, no tóxico, económico, fácil de conseguir y de alta calidad para la fabricación de andamios. Otro de los beneficios de utilizar PCL para la fabricación de andamios porosos es que actualmente cuenta con la aprobación de la FDA, ya que, ha sido utilizado en diversos procesos regenerativos de cartílago y hueso, asimismo, ha sido utilizado para la fabricación de diversos aditamentos médicos y para la administración de fármacos. Además los andamios fabricados por medio de la técnica de lixiviación de partículas y fundición de disolventes, proporcionan una estructura y entorno adecuado, similar a la matriz extracelular del tejido óseo, ya que, el andamio 3D cuenta con el tamaño de poro e interconectividad adecuada lo que permite la adhesión, proliferación y diferenciación celular.

## **I.- Marco teórico**

### **1.1 Tejido Óseo**

El tejido óseo comúnmente denominado hueso es un tejido conectivo especializado, dinámico, mineralizado, heterogéneo, organizado jerárquicamente en niveles estructurales, formado por una matriz con componentes orgánicos e inorgánicos y agua, en donde intervienen distintos procesos celulares y bioquímicos, su principal función es proporcionar un soporte mecánico para la locomoción, así como brindar protección a los órganos vitales de cuerpo humano. Participa en la regulación de la homeostasis mineral, hematopoyética y cumple una función endocrina importante (1).

#### **Células del tejido óseo**

Las células que conforman el tejido óseo son osteoclastos, osteocitos y osteoblastos. Los osteoclastos son las células primarias involucradas en la resorción ósea durante la remodelación ósea, son células multinucleadas provenientes de células mononucleares del linaje de las células madre hematopoyéticas, las cuales requieren de varios factores tales como, el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) secretado por células mesenquimales osteoprogenitoras y osteoblastos, el ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa\beta$  (RANK-L) secretado por osteocitos, osteoblastos y células estromales y la osteoprotegerina (OPG) secretada por las células estromales, osteoblastos, linfocitos B, fibroblastos gingivales, fibroblastos periodontales y células epiteliales, estos tres factores fomentan la activación de factores de transcripción regulando la proliferación, diferenciación y supervivencia de los osteoclastos así como su participación en la osteoclastogénesis. Dentro de las funciones de estos tres factores el M-CSF estimula la diferenciación, migración y supervivencia de los osteoblastos, el RANKL facilita la formación de osteoblastos y la OPG inhibe la diferenciación de los osteoclastos impidiendo la interacción de RANKL con el receptor de RANK inhibiendo la osteoclastogénesis. Durante la remodelación ósea, los precursores de los osteoclastos son reclutados hacia la superficie del hueso, donde proliferan, se diferencian y se fusionan en células multinucleadas maduras, estos osteoclastos maduros tienen una morfología polarizada con varios dominios



estructurales y funcionales que les permite funcionar como células de reabsorción ósea, en las cuales se pueden observar cuatro tipos de dominios de la membrana de los osteoclastos: la zona del sellado y el borde ondulado que están en contacto con la matriz ósea, así como los dominios secretorios basolaterales y funcionales los cuales no están en contacto con la matriz ósea, la polarización de los osteoclastos conlleva el reordenamiento del citoesqueleto de actina donde se forma un anillo de F actina que comprende una zona densa continua de podosoma y en consecuencia se aísla un área de membrana la cual se desarrolla en el borde ondulado, que representa una zona importante para la actividad de los osteoclastos, esta estructura está formada por microvellosidades debido al intenso tráfico de componentes endosomales y lisosomales, en esta zona, se encuentra una  $H^{+}$ -ATPasa de tipo vacuolar (V-ATPasa), la cual ayuda a acidificar la laguna de reabsorción, ayudando a la disolución de cristales de hidroxiapatita, otras enzimas importantes que participan en esta zona son, la catepsina K, la matriz metaloproteínasa-9 (MMP-9) y la fosfatasa resistente al tartrato ácido (TRAP), las cuales son transportadas a la laguna de Howship conduciendo a la degradación ósea, tras esta degradación los productos producidos son endocitados y descompuestos por los lisosomas para posteriormente ser llevados al medio extracelular o a la superficie basolateral (1,2).

Otra de las células que conforman el tejido óseo son los osteoblastos, los cuales son los responsables de la formación de hueso, su función principal es sintetizar la matriz ósea y son originados a partir de células troncales mesenquimales (MSC) que requieren de la expresión de genes específicos incluyendo la síntesis de Proteínas Morfogénicas Óseas (BMP) y de miembros de las vías Wingless (Wnt) para su diferenciación a un linaje osteoprogenitor, la expresión de genes como Runt-Related Transcription factor 2 (Runx 2), Distal-Less Homeobox 5 (Dlx5) por sus siglas en inglés y Osterix (Osx) son necesarios para la diferenciación de osteoblastos, Runx2 es expresada en etapas más tempranas que Osterix pero ambas proteínas participan en la regulación de la expresión de genes tales como, Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein (BGLAP) que codifica para la Osteocalcina (OC), Secreted Phosphoprotein 1 (SPP1) la cual codifica para la Osteopontina (OPN), Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13) que

además, desempeña un papel en la degradación de proteínas de la matriz extracelular, así como la Osteoprotegerina (OPG) y el ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa\beta$  (RANKL) controlando así, la formación y remodelación ósea, al completar el proceso de formación ósea, alrededor del 60-80% de los osteoblastos mueren por apoptosis (2,3).

Finalmente, los osteocitos son osteoblastos maduros los cuales quedan sepultados durante el proceso de deposición ósea, distribuyéndose por toda la matriz ósea mineralizada, son las células más longevas y constituyen el 90-95% de las células del tejido óseo, se encuentran dentro de la matriz ósea mineralizada formando procesos dendríticos los cuales se extienden hacia los canalículos, a través de los cuales los osteocitos forman redes que interactúan con otros osteocitos, células en la superficie ósea y la médula, detectando el entorno local y sistémico dentro del hueso, también expresan y liberan proteínas las cuales envían distintas señales a los osteoblastos, osteoclastos y otras células que se encuentran en los huesos respondiendo de esta forma a los cambios ambientales, los osteocitos son las únicas células del hueso que producen esclerostina como producto del gen SOST la cual se encuentra en niveles elevados en los canalículos, siendo un antagonista del sistema Wnt/ $\beta$  catenina conduciendo a la supresión de la formación ósea. Los osteocitos también producen RANKL y OPG los cuales son reguladores esenciales en la osteoclastogénesis (1,4).

### **Matriz ósea**

La matriz ósea está compuesta por componentes orgánicos (40%) e inorgánicos (60%). La matriz orgánica en su mayoría está compuesta por colágeno tipo I (~90%), además de cantidades pequeñas de colágeno tipo III, V, X, XII y de proteínas no colágenas (10%) como, Osteocalcina (OC), Osteonectina (ON), Osteopontina (OPN), Fibronectina (FN), Sialoproteína ósea II, Proteínas Morfogénicas Óseas (BMP) y diversos factores de crecimiento los cuales desempeñan un papel importante en la regulación de la formación de colágeno y el tamaño de las fibras; así como en la mineralización y en la unión celular, aproximadamente el 85% de las proteínas no colágenas son proteínas extracelulares como los SLRP por sus siglas en inglés (Small Leucine Rich Proteoglycans) entre los que se encuentran, el biglicano, la decorina, el

queratocano y la asporina, los cuales interactúan con receptores de la superficie celular y las citocinas participando en la regulación de los comportamientos celulares tanto normales como patológicos, también participan en las distintas etapas durante la formación de tejido óseo como, la proliferación celular, la osteogénesis, la deposición de minerales y la remodelación ósea, por otro lado, el resto de las proteínas no colágenas se van a encontrar dentro de las células del tejido óseo; en cuanto a la matriz inorgánica del tejido óseo sus componentes principales son iones de fosfato y calcio, así como bicarbonato, potasio, sodio, magnesio, citrato, carbonato, fluorita, zinc, estroncio y bario, los cuales se encuentran en cantidades importantes. El componente principal de los tejidos duros del organismo, como el hueso y la dentina, es la hidroxiapatita (HA,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ), la cual se forma a través de la enucleación de iones de calcio y fosfato formando cristales de hidroxiapatita con la fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , los cuales en conjunto de la matriz orgánica del tejido óseo forman un andamio para la deposición de hidroxiapatita, el cual se lleva a cabo a través del proceso de biomineralización, la asociación entre los componentes de la matriz inorgánica e orgánica es responsable de la rigidez y resistencia del tejido óseo. El colágeno tipo I es el componente principal (90%) del colágeno total en el tejido óseo, otros de los componentes abundantes de la matriz orgánica del tejido óseo son el colágeno tipo III y V, los cuales tiene como función principal proporcionar soporte mecánico y comportarse como un andamio para las células del tejido óseo, el colágeno tipo I, proporciona fuerza y dureza, controlando el tamaño y la orientación de los cristales de hidroxiapatita regulando la fibrillogénesis del colágeno promoviendo la unión, proliferación y diferenciación celular, otras proteínas de gran importancia son la Sialoproteína Ósea (BSP) la cual es un nucleador de hidroxiapatita y puede unirse a la hidroxiapatita y al colágeno tipo I, la OPN la cual regula el tamaño de los cristales de hidroxiapatita, el crecimiento de los mismos y promueve la unión de los osteoclastos a la matriz inorgánica del tejido óseo y la OC la cual es la encargada de promover el reclutamiento y la unión de los precursores osteoclastos induciendo su diferenciación (2,5,6).

## **Mineralización de la matriz extracelular del tejido óseo**

La mineralización del tejido óseo es el proceso en el cual los cristales de hidroxiapatita se acumulan en la matriz orgánica del tejido óseo de una forma específica y ordenada, este proceso está relacionado con la expresión de diversas proteínas colágenas y proteínas no colágenas, como la OC, la OPN y la BSP las cuales como ya se mencionó anteriormente, promueven la formación de tejido óseo, así como la mineralización. Durante el proceso de mineralización los cristales de hidroxiapatita se van acumulando de forma ordenada y sistemática sobre la matriz extracelular, donde las células que se encuentran rodeando la matriz mineral organizando un patrón para la acumulación de los minerales, iniciando así la ubicación de la mineralización y estableciendo las dimensiones finales de los cristales de hidroxiapatita, en la actualidad existen dos modelos importantes que describen el proceso de mineralización del tejido óseo, los cuales son, el modelo denominado mineralización moderada por colágeno, donde el colágeno provee una plantilla para la acumulación de cristales de hidroxiapatita, por lo tanto las fibras de colágeno deciden el tamaño de los cristales de hidroxiapatita, además se ha informado que una deficiencia de proteínas no colágenas de la matriz extracelular del tejido óseo como OPN y ON no permiten se lleve a cabo el proceso de mineralización, ya que estas proteínas no colágenas participan en la regulación de la formación de cristales de hidroxiapatita, por otra parte en el modelo de mineralización moderada matriz-vesícula, las vesículas de matriz se van a derivar de la matriz extracelular ya que se encuentran dentro de ella, proporcionando la ubicación inicial para la calcificación del tejido óseo y participando en la formación de cristales primarios de hidroxiapatita los cuales tienen lugar dentro de la matriz de membrana de la vesícula (7,8).

Otra molécula de gran importancia implicada en el proceso de mineralización es la vitamina D cuya fórmula es  $C_{27}H_{44}O$ , existen tres fuentes de obtención de la vitamina D, las cuales son, por medio de la exposición solar, los alimentos y los suplementos, después de su obtención la vitamina D debe sufrir dos hidroxilaciones en el cuerpo para poder activarse, la primera hidroxilación se produce en el hígado convirtiendo la vitamina D en 25-hidroxivitamina D [25 (OH) D], la segunda hidroxilación ocurre en el riñón formando la 1,25-dihidroxivitamina

D [1,25 (OH) 2D] considerada un producto activo, una de las funciones principales de la vitamina D es fomentar la absorción de calcio en el intestino y mantener las concentraciones séricas adecuadas de calcio y fosfato, promoviendo el proceso de mineralización del tejido óseo de manera normal, así como, el crecimiento y la remodelación del tejido óseo. Además, puede afectar el crecimiento y la diferenciación de los osteoblastos estimulando la formación y mineralización del tejido óseo, modulando el proceso de deposición ósea evitando así una mineralización excesiva y patológica, asimismo la vitamina D puede inducir la actividad de la fosfatasa alcalina y aumentar la expresión de colágeno tipo I durante la proliferación y diferenciación de los osteoblastos (9,10).

### **Tipos de hueso**

A nivel macroscópico la literatura refiere dos tipos de hueso: cortical y trabecular, los cuales pueden distinguirse entre ellos por su porosidad, ubicación y función, el hueso cortical también llamado hueso compacto constituye aproximadamente el 80% de la masa total del tejido esquelético, siendo mucho más denso y sólido que el hueso trabecular ya que rodea a la médula ósea, además tiene una baja porosidad, por lo tanto, estas características le confieren al hueso cortical una gran resistencia a la compresión, contribuyendo así a la función mecánica que tiene principalmente este tipo de hueso, por otra parte, el hueso trabecular también conocido como hueso esponjoso constituye aproximadamente el 20% de la masa total del tejido esquelético, este tipo de hueso está compuesto por finas trabéculas las cuales se entrecruzan en diferentes direcciones, formando así, un reticulado esponjoso, cuyos espacios huecos están ocupados por la médula ósea, vasos sanguíneos, tejido fibroso y tejido adiposo, este tipo de hueso es poroso, delgado y cumple una función metabólica, tanto el hueso cortical como el trabecular están compuestos por osteonas, denominadas osteonas corticales o sistemas de Havers, los cuales son los encargados de formar una red ramificada dentro del hueso cortical ya que presentan una forma cilíndrica, además las paredes de estos sistemas de Havers están formadas por laminillas concéntricas, por otra parte las osteonas que componen el hueso trabecular son denominadas osteonas trabeculares, las cuales presentan una forma de un disco plano de unos aproximadamente 70  $\mu\text{m}$  de espesor y una longitud de 600  $\mu\text{m}$ , este disco está formado por aproximadamente 20 láminas

paralelas a la superficie del disco, por lo que las trabéculas varían entre 10 y 400  $\mu\text{m}$  (11,12,13).

### **Nivel microestructural del tejido óseo**

El hueso puede organizarse de diversas formas a nivel microestructural, estas formas de organización están determinadas por su función y la forma en las que son depositadas, según la literatura, menciona que por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) se han podido observar dos tipos de hueso a nivel microestructural, los cuales son: reticular o laminar. El hueso reticular también llamado primario o inmaduro es el primero que se forma, este tipo de tejido tiene abundantes cantidades de osteocitos y haces irregulares de colágena, las cuales son reemplazadas y organizadas posteriormente en hueso secundario, excepto en ciertas zonas, como por ejemplo, en las suturas de la bóveda craneal, los sitios de inserción de los tendones y los alveolos óseos que rodean a los órganos dentarios, por lo tanto en el adulto solo aparecerá en ciertas circunstancias reparadoras o patológicas, otra característica de este tipo de hueso es que el contenido mineral es menor que el del hueso secundario, por otra parte el hueso laminar también llamado hueso maduro o secundario comienza a formarse después del nacimiento sustituyendo completamente al hueso reticular a los 4 años de edad, este tipo de hueso está compuesto por laminillas óseas paralelas o concéntricas, cada una de 3-7  $\mu\text{m}$  de grosor aproximadamente, además las fibras de colágeno del hueso secundario se encuentran organizadas de forma paralela entre sí dentro de una laminilla determinada, otorgándole una fuerza mayor al hueso secundario (14,15,16).

### **Histogénesis del tejido óseo**

Existen tres linajes diferentes a partir de los cuales se origina el esqueleto, por ejemplo, los somitas forman el esqueleto axial, mientras que el mesodermo de la placa lateral es el encargado de formar el esqueleto de la extremidad y la cresta neural craneal da lugar a la formación del arco branquial, los huesos y los cartílagos craneofaciales, por lo tanto existen dos tipos principales de formación ósea u histogénesis, los cuales son: osificación intramembranosa y osificación endocondral, en donde está implicada la transformación de un tejido mesenquimatoso preexistente en tejido óseo, a este proceso fisiológico se le

denomina osificación, durante este proceso el hueso se mineraliza para así poder adquirir la consistencia dura que lo caracteriza. El sitio del hueso donde comienza el proceso de osificación se denomina núcleo óseo o centro de osificación, además estos centros pueden originarse en distintos puntos del hueso y en distintos momentos, por lo tanto, el primer punto de osificación es denominado centro de osificación primaria, mientras que los posteriores centros de osificación se denominan centros de osificación secundarios, como ya se mencionó anteriormente existen dos tipos de osificación, las cuales son: intramembranosa y endocondral.

La osificación intramembranosa es el proceso de mineralización que se presenta a partir de una membrana de tejido conjuntivo, este proceso inicia a partir de la mesénquima fetal dando origen a la gran mayoría de los huesos planos, los cuales comprenden a los huesos del cráneo. Durante la osificación intramembranosa en el cráneo, las células mesenquimales que derivan de la cresta neural proliferan y posteriormente se condensan en nódulos compactos, algunas de estas células se convierten en vasos sanguíneos y osteoblastos, los cuales son los encargados de secretar la matriz orgánica, esta matriz recién sintetizada no calcificada se denomina osteoide, la cual está compuesta por proteoglucanos y fibras de colágeno sin un contenido de sales minerales, posteriormente esta matriz orgánica sufre una acelerada mineralización, la cual se lleva a cabo por la deposición de fosfato de calcio, por lo tanto algunos osteoblastos van a estar localizados a lo largo de la región calcificada de la matriz, mientras que otros van a quedar atrapados dentro de la matriz calcificada convirtiéndose en osteocitos, por lo tanto, el resultado es la formación de un tejido óseo primitivo vascularizado rodeado por una membrana condensada de mesénquima, la cual posteriormente se transforma en periostio. Por otra parte, la osificación endocondral es el proceso de mineralización que se lleva a cabo a partir de un modelo de cartílago hialino proveniente del mesénquima, este tipo de osificación es el encargado de formar los huesos largos y cortos del esqueleto, al principio de este proceso las células mesenquimales se comprometen a diferenciarse en condrocitos a través de distintos factores paracrinos los cuales inducen a las células mesodérmicas a expresar distintos factores de transcripción como: Pax1 y Escleraxis, los cuales son capaces de

activar genes específicos del cartílago, posteriormente estas células mesenquimales se condensan en nódulos compactos para diferenciarse a condrocitos, los cuales van a proliferar rápidamente para formar el modelo de hueso secretando una matriz extracelular específica del cartílago, más tarde estos condrocitos van a dejar de dividirse y aumentan su volumen convirtiéndose en condrocitos hipertróficos los cuales, van a modificar la matriz extracelular que producen permitiendo su mineralización con carbonato de calcio, finalmente los condrocitos hipertróficos mueren por apoptosis y a medida de que esto sucede un grupo de células que rodea el modelo cartílago se diferencian en osteoblastos, los cuales comienzan a secretar la matriz extracelular del tejido óseo en el cartílago, de esta forma todo el cartílago es reemplazado por hueso (13,17).

## **1.2 Defectos maxilofaciales**

Los huesos cráneo-maxilofaciales comprenden tanto a los huesos del cráneo como a los huesos del macizo facial, los cuales pueden sufrir trastornos y/o pérdida de su estructura ósea debido a distintos factores tales como: la enfermedad periodontal, traumatismos, anomalías congénitas, atrofia del hueso relacionada a distintos síndromes, reabsorción ósea asociada a tumores benignos o malignos, entre otros, comprometen significativamente la calidad de vida del paciente (18,19).

La enfermedad periodontal también denominada periodontitis es una enfermedad inflamatoria de los tejidos blandos periodontales que conlleva a la pérdida gradual del ligamento periodontal y del hueso alveolar, esta enfermedad afecta a más de 700 millones de personas, representando alrededor del 11% de la población mundial, por lo tanto, es considerada una de las enfermedades inflamatorias crónicas más prevalentes en todo el mundo, otro aspecto de gran importancia es la clasificación de los defectos óseos como resultado de la enfermedad periodontal, los cuales se pueden clasificar como: supra óseos e infra óseos, los defectos supra óseos también denominados supracrestales se presentan cuando la base de la bolsa es localizada coronal u oclusal a la cresta ósea, mientras que los defectos infra óseos se llegan a presentar cuando el extremo apical de la bolsa se encuentra debajo de la cresta ósea, este tipo de defectos puede subdividirse en tres categorías con respecto al número de



paredes óseas restantes, estas categorías son: defecto de 1 pared, defectos de 2 paredes y defectos de 3 paredes, además las afectaciones en la furca también pueden ser incluidas en el grupo defectos óseos periodontales, en 1953 Glickman, fue uno de los primeros en introducir la clasificación de los defectos interradiculares, los cuales tomaban en cuenta tanto la dimensión horizontal como la dimensión vertical de la pérdida ósea, la pérdida ósea horizontal es una de las más comunes en la enfermedad periodontal, en la cual el hueso muestra una altura reducida, pero el margen óseo permanece aproximadamente perpendicular a la superficie del diente, mientras que las placas interdetales se ven afectadas, sin embargo, esto no sucede al mismo grado alrededor del diente, este tipo de pérdida ósea tiene un pronóstico desfavorable, ya que el injerto óseo que sea colocado en esa zona no va a recibir suficiente irrigación vascular, por lo tanto, esto lleva a la pérdida del tejido de *novo*. Por otro lado, la pérdida ósea vertical se presenta en dirección oblicua, presionando el hueso a lo largo de la raíz, por lo tanto, la base del defecto es localizada apical al hueso circundante, teniendo un pronóstico favorable para la regeneración ósea (20,21,22).

Una de las clasificaciones más utilizadas en la actualidad es la de Hamp *et al.*, En donde: Grado I: Corresponde a la pérdida de hueso horizontal que no excede el tercio del ancho del diente. Grado II: Corresponde a la pérdida de hueso horizontal que excede un tercio del ancho del diente, pero no involucra el ancho total del área de bifurcación. Grado III: El cual corresponde a la destrucción ósea total. Otros autores han clasificado los defectos óseos como hemiseptum, cráter interdental, defectos intraóseos e invasiones de furcación (21,22).

El tratamiento de elección principal para tratar la enfermedad periodontal es el raspado y alisado radicular (SRP), sin embargo, este tratamiento tiene sus limitaciones, ya que no puede retirar patógenos de defectos intraóseos profundos, por lo que la infección continua proliferando, otra de las terapias que se han utilizado para tratar la enfermedad periodontal es la administración de antibióticos de manera local en las bolsas periodontales, sin embargo, en este tipo de terapia se dificulta mantener una concentración terapéutica adecuada del fármaco utilizado, además, existe la posibilidad de desarrollar resistencia microbiana por el uso de antibióticos, asimismo, una de las limitantes más importantes en los tratamientos para tratar la enfermedad periodontal es que los

tejidos periodontales no se regeneran, por lo tanto, en la actualidad existen tratamientos quirúrgicos como la regeneración tisular guiada (GTR) la cual es un procedimiento que intenta regenerar los tejidos periodontales perdidos, utilizando distintos materiales de barrera para poder excluir el tejido epitelial y conectivo gingival de la raíz y la superficie ósea, permitiendo la repoblación de las células del ligamento periodontal así como la proliferación y el establecimiento del ligamento periodontal y de las estructuras óseas, otros beneficios que ofrece este procedimiento, es que se mejora la ganancia de inserción, se reduce la profundidad de la bolsa y se tiene un menor aumento de la recesión gingival, sin embargo, aún existen limitaciones en este tipo de procedimientos que garanticen el éxito de la regeneración periodontal (21,23,24).

Es importante mencionar que los defectos óseos maxilofaciales resultantes de diversos factores, tales como: traumatismos, defectos congénitos, infecciones crónicas, resecciones quirúrgicas debido a tumores malignos o benignos, requieren de una intervención clínica y quirúrgica, actualmente la técnica más utilizada es el injerto óseo autólogo, sin embargo presenta limitaciones, es por esta razón que la ingeniería de tejidos a través de una combinación de andamios, factores de crecimiento y suministro de células, tiene un gran potencial para poder abordar los desafíos que existen en el manejo de este tipo de defectos (25).

### **1.3 Regeneración del tejido óseo**

El tejido óseo posee una capacidad intrínseca de remodelarse y regenerarse espontáneamente, sin embargo, dicha capacidad no se extiende en defectos de un cierto tamaño, los cuales son considerados críticos, en estos casos el tejido óseo no se regenera por sí solo, por lo cual, existe la necesidad de intervenir quirúrgicamente al paciente, como ya se mencionó anteriormente, el tejido óseo es un tejido dinámico, el cual se mantiene en un estado de homeostasis mediado por células del tejido óseo, por lo tanto, cuando existe una fractura derivada de un trauma óseo ocurre una cascada de eventos osteogénicos, donde participan numerosos fenotipos celulares, proteínas de matriz y moléculas de señalización que participan en la reparación de dicha fractura, este tipo de fractura es denominada como un defecto de tamaño subcrítico ya que es considerada una fractura que se regenera espontáneamente, logrando la restauración de la forma

del defecto y reestableciendo su función, por consiguiente, la reparación del tejido óseo, también llamada consolidación ósea, puede dividirse en: consolidación ósea directa, primaria o cortical y consolidación ósea indirecta o secundaria, en la consolidación ósea primaria la distancia entre las superficies de la fractura ósea es muy pequeña, ya que se encuentra limitada por la fijación, por lo tanto, en este tipo de consolidación existe un restablecimiento de la corteza con la ausencia de la formación de un callo óseo y de tejido cartilaginoso o conectivo, mientras que, la consolidación ósea secundaria es la forma más común de reparación del tejido óseo y se lleva a cabo, cuando los bordes de la fractura tienen menos del doble del diámetro del tejido óseo lesionado, además en este tipo de consolidación existe la formación de tejido de granulación y de un callo óseo, el cual tiene una forma adecuada para poder soportar las cargas mecánicas durante el proceso de reparación y la remodelación posterior que se llevará a cabo, además se presentan diversos eventos tales como: la coagulación, una respuesta inflamatoria, la formación de callos de fibrocartilago, la osificación intramembranosa, la osificación endocondral y la remodelación ósea, están implicados en el proceso de la consolidación ósea secundaria (26,27,28,29,30). La primera etapa de la consolidación secundaria comienza inmediatamente después de la fractura, ya que, los vasos sanguíneos que irrigan el tejido óseo y el periostio se rompen, produciendo un hematoma en la periferia de la fractura que posteriormente va a formar un coágulo el cual ayudará en el proceso de reparación de la fractura, en esta etapa se secretan distintas moléculas tales como: las citocinas proinflamatorias, por ejemplo, el Factor de necrosis tumoral (TNF-  $\alpha$ ), Interleucinas (IL) como, la Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 11 (IL-11) y las BMP's, las cuales son esenciales para poder atraer células que eliminen el tejido dañado y se secreten nuevas citocinas como el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), el cual va a estimular el proceso de reparación en el sitio de la fractura, ayudando a la formación de tejido de granulación rico en fibrina, además, células troncales mesenquimales son reclutadas en el sitio del defecto para posteriormente diferenciarse en fibroblastos, condroblastos y osteoblastos, para que, de esta forma se pueda iniciar el proceso de condrogénesis y la deposición de una capa de tejido óseo por medio de las células osteoprogenitoras. A partir de aproximadamente 11 días después del inicio de la fractura, se empieza a llevar

a cabo el proceso de osificación endocondral en el callo cartilaginoso que se formó, en esta etapa se expresa RANK-L el cual es responsable de que se presente una mayor diferenciación de condrocitos, osteoblastos y osteoclastos, los cuales van a participar en los procesos de reabsorción y calcificación del callo cartilaginoso, al final de esta etapa se forma un callo duro y calcificado de hueso inmaduro, finalmente se lleva a cabo el proceso de remodelación ósea en el cual existe una migración continua de los osteoblastos y osteoclastos, provocando una remodelación repetida en el callo duro denominada remodelación acoplada, la cual presentan un equilibrio entre la reabsorción por los osteoclastos y la formación de hueso nuevo por los osteoblastos, por lo tanto, el centro del callo es reemplazado por hueso compacto, mientras que los bordes del callo son reemplazados por hueso laminar, este proceso de remodelación del tejido óseo dura muchos meses dando como resultado la regeneración de la estructura ósea normal (31).

#### **1.4 Tratamientos**

Los defectos óseos maxilofaciales de tamaño crítico causados por diversas etiologías, no tienen la capacidad para regenerarse por sí solos, por lo tanto, necesitan ayuda de una intervención externa, en la actualidad, los tratamientos quirúrgicos para poder tratar los defectos óseos maxilofaciales de tamaño crítico han ido mejorando durante los últimos años, sin embargo, las estrategias metodológicas más utilizadas para tratar la pérdida o daño óseo son los injertos, tales como: autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos, isoinjertos e injertos aloplásticos, siendo los más utilizados los autoinjertos, cuales presentan ciertas limitaciones, ya que requieren múltiples cirugías y la disponibilidad del tejido son limitadas (32,33). Por estas razones la ingeniería de tejidos (IT) se ha convertido en una nueva terapia potencial para el área odontológica, ya que, los defectos óseos son afecciones que oscilan desde recesiones que miden milímetros hasta la resección completa de la mandíbula, siendo tratadas, por ejemplo, con hueso liofilizado, membranas o prótesis metálicas, que en la mayoría de los casos devuelven la función de manera limitada (32,34).

En la actualidad uno de los principales objetivos de la terapia periodontal es interrumpir el desarrollo de la enfermedad periodontal y cuando sea posible, regenerar y restaurar la función los tejidos periodontales perdidos o dañados, sin

embargo, los tratamientos actuales utilizados para regenerar y reparar el tejido periodontal presentan grandes desafíos, por estas razones la ingeniería de tejidos (IT) se ha convertido en una nueva terapia potencial, la cual tiene como objetivo principal regenerar y reemplazar los tejidos afectados, restaurando su función y estructuras normales. Dentro de los tratamientos periodontales más utilizados en las últimas décadas en la terapia periodontal regenerativa se encuentran: la regeneración tisular guiada (GTR), el derivado de la matriz del esmalte (DME), y el uso de distintos injertos óseos, los cuales, fueron desarrollados para poder reemplazar los tejidos periodontales afectados, sin embargo, los resultados clínicos de esos enfoques son variables e impredecibles. Por otra parte, la IT es un campo relativamente nuevo, multidisciplinario el cual se centra en el uso de biomateriales y la administración controlada de fármacos para la regeneración periodontal, mediante la preparación de andamios tridimensionales, sembrados con células y factores de crecimiento, estas tres estrategias metodológicas se conocen como la triada de la ingeniería de tejidos, las cuales son de gran importancia para la regeneración de los tejidos óseos de los defectos maxilofaciales y periodontales (18,35).

En este apartado se abordarán los principales tratamientos utilizados en la actualidad para la regeneración del tejido óseo, incluyendo, el uso de injertos, andamios, células, factores de crecimiento, entre otros.

### **Sustitutos óseos**

Los sustitutos óseos pueden definirse como un biomaterial natural o sintético, orgánico, inorgánico o combinado, el cual es utilizado para rellenar o reparar defectos óseos, además, este biomaterial debe tener ciertas características como: proporcionar una estructura tridimensional, ser osteoconductor e osteoinductor, biocompatible, reabsorbible, con una estructura y biomecánica similar a la del tejido óseo, de fácil manejo y disponible a un bajo costo (36,37).

En la actualidad los materiales sustitutos más utilizados en el área de la odontología pueden clasificarse en cinco categorías, tales como en la Figura 1. las cuales son:

- 1) Los materiales de origen natural, los cuales derivan de una fuente viva sin modificaciones, dentro de estos se encuentran los autoinjertos, aloinjertos,

xenoinjertos y los materiales fitogénicos. 2) Sustitutos óseos sintéticos como, por ejemplo, metales, polímeros, sulfatos de calcio, entre otros. 3) Sustitutos óseos compuestos. 4) Sustitutos óseos basados en factores de crecimiento. 5) Sustitutos óseos con células vivas (38).

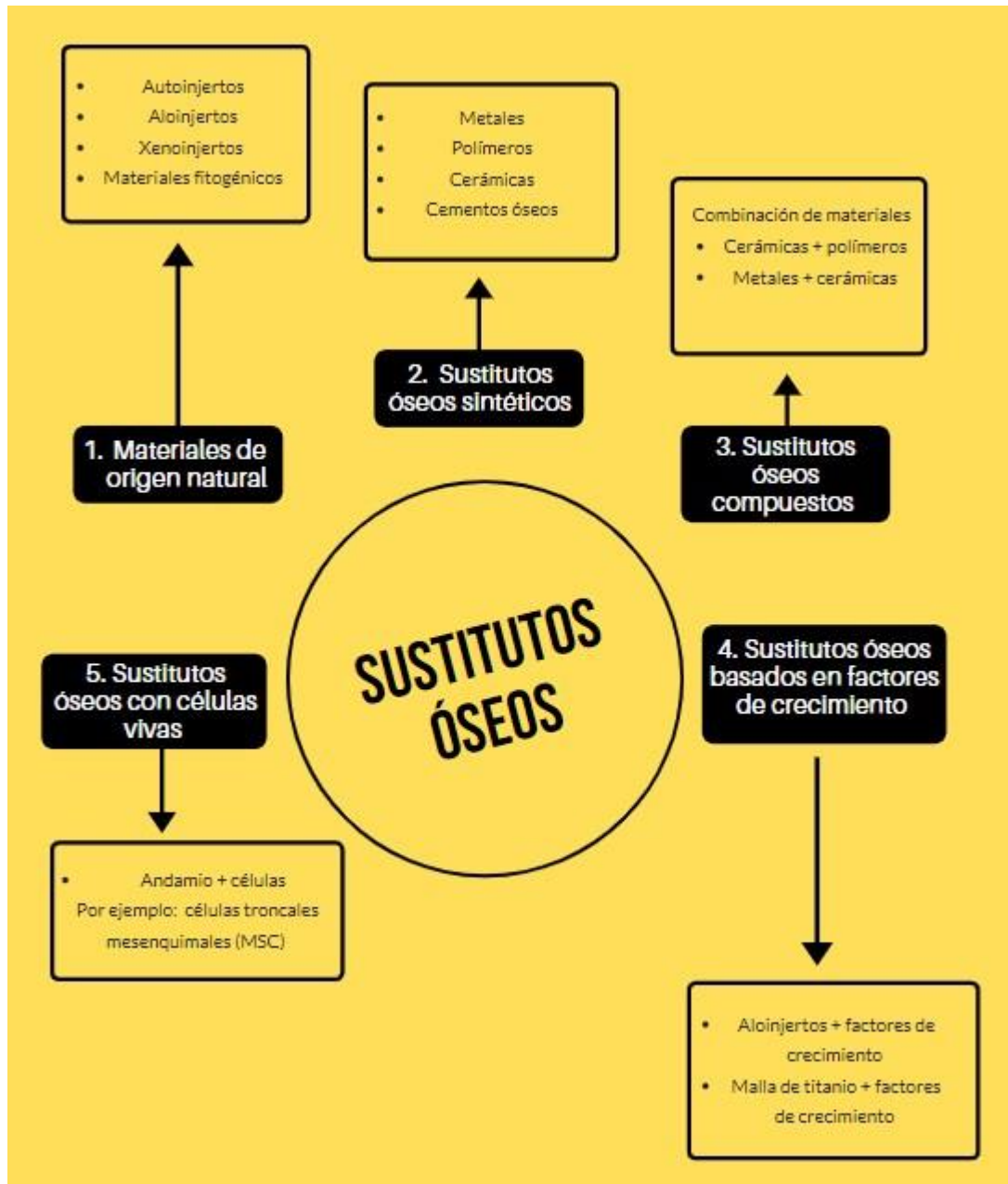


Figura 1. Clasificación de los sustitutos óseos utilizados para el tratamiento de defectos del tejido óseo. Fuente propia.

## **Injertos óseos**

Un injerto óseo es definido como un tejido vivo, el cual, es capaz de fomentar la regeneración del tejido óseo cuando es trasplantado a un defecto óseo, ya sea en combinación con otros materiales o solo. En la actualidad, el injerto óseo es uno de las estrategias metodológicas más utilizadas en distintas áreas de la medicina como: traumatología, cirugía oral, cirugía maxilofacial y ortopedia, ya que el fin del injerto es el del formar tejido óseo de *novo* en el área del defecto, por lo tanto, los injertos más utilizados comúnmente son los autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos, isoinjertos y los injertos aloplásticos (39,40,41).

### **Injerto óseo autólogo**

El injerto óseo autólogo también llamado autoinjerto, en la actualidad es considerado el estándar de oro, ya que presenta propiedades osteogénicas, osteoinductivas y osteoconductoras, también es histocompatible y no inmunogénico, por lo tanto, es utilizado para sustituir o rellenar defectos óseos, este tipo de injerto es recolectado de un sitio del mismo paciente para posteriormente ser trasplantado en un sitio diferente donde se desea sustituir o rellenar el defecto óseo, específicamente el autoinjerto tiene los componentes necesarios para conseguir la osteoinducción, es decir, proteínas morfogénicas óseas (BMP) y otros factores de crecimiento, tales como, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), los cuales van ayudar a la diferenciación de las células troncales mesenquimales (MSC) en osteoblastos, asimismo, posee los componentes necesarios para que se pueda llevar a cabo la osteogénesis a través de las células osteoprogenitoras y la osteoconducción mediante la formación de un andamio bioactivo en el que las células huésped puedan crecer, otro de los beneficios que se puede obtener a través de un autoinjerto es la osteogénesis, ya que, los autoinjertos contienen osteoblastos, células sanguíneas, médula ósea y la capacidad de inducción osteogénica necesaria que contribuyen a la osteogénesis, por otra parte, otros tipos de injertos no tiene la capacidad de contribuir a la osteogénesis ya que estimulan una respuesta inmunitaria, sin embargo, existen varias desventajas relacionadas con este tipo de injerto, como la necesidad de realizar una segunda cirugía para poder obtener el injerto, lo que puede causar ciertas complicaciones como

lesiones, deformidad, morbilidad y cicatrices en el sitio donante, además, al recolectar el injerto e implantarlo en otra zona hace que el proceso sea más costoso y se asocie a diversos riesgos tales como, sangrado, inflamación, infección y dolor crónico, asimismo, los autoinjertos pueden ser no la mejor opción de tratamiento para rellenar o sustituir defectos de mayor tamaño, ya que la cantidad de tejido que se obtiene es limitado, además, a pesar de las características que presentan los autoinjertos, estos pueden presentar hasta un 50% de reabsorción e integración inadecuada (38,42,43,44).

Existen dos tipos de autoinjertos los cuales son: los autoinjertos corticales y los autoinjertos de hueso esponjoso, el primero de ellos presentan ciertas características como, baja porosidad, carece de osteoblastos y células osteogénicas, además las células del hueso cortical son menos resistentes al trasplante ya que existe una menor transferencia de nutrientes, sin embargo, este tipo de injerto proporciona una integridad estructural-mecánica, la cual permite la regeneración del tejido óseo a través de la osteoconducción, otra de sus características es que este tipo de injertos se integran de una forma más lenta en comparación con los injertos esponjosos y son una buena opción para reparar defectos óseos segmentarios menores de 5-6 cm, sin embargo, debido a la poca revascularización que se presenta en este tipo de injertos pueden aparecer fracturas, especialmente en autoinjertos corticales grandes. Por otra parte, tenemos a los autoinjertos de hueso esponjoso, los cuales son los más utilizados para el rellenar o sustituir defectos óseos, debido a que este tipo de injerto posee ciertas características como, una superficie trabecular adecuada la cual facilita que se propicie un entorno osteoinductivo óptimo, el cual beneficiará la revascularización y la correcta incorporación en el sitio receptor (38,44).

### **Injerto de hueso alogénico**

El injerto de hueso alogénico también llamado aloinjerto óseo es un tejido obtenido de dos individuos genéticamente no idénticos de la misma especie, es decir, de un individuo diferente, por lo tanto, el tejido puede ser obtenido de un donante vivo o de un cadáver, una de las ventajas de este tipo de injerto es que puede encontrarse en diferentes presentaciones, tales como, partículas de hueso esponjoso troceado, hueso corticoesponjoso, láminas de hueso cortical o como segmentos completos de hueso estructural, por lo que, el uso de cada una



de estas presentaciones va a depender en función de los requerimientos del defecto óseo a rellenar o sustituir, otras de sus ventajas de este tipo de injerto es la ausencia de morbilidad del sitio donante, la disponibilidad de soporte mecánico con diversas formas y tamaños, además en la actualidad, con el desarrollo de las pruebas de detección de donantes y con el uso de distintos procesos de esterilización utilizados se puede minimizar el riesgo de transmisión de infecciones y de enfermedades, sin embargo, los diferentes métodos de utilizados para su esterilización pueden reducir las propiedades osteogénicas y osteoinductivas de este tipo de injerto, adicionalmente, este tipo de injertos puede obtenerse mediante distintos tipos de procesamiento, por lo que las propiedades pueden variar ampliamente, por lo tanto, estos pueden clasificarse en, aloinjertos frescos, frescos congelados, liofilizados y desmineralizados, por ejemplo, los aloinjertos frescos son los más costosos y los que menos se encuentran disponibles comparados con los que tiene una vida útil más larga, otra de sus características es que estos autoinjertos poseen una mayor resistencia y capacidad osteogénica, sin embargo, el costo, la vida útil y la disponibilidad se ven comprometidos comparados con los aloinjertos recién congelados los cuales no son tan rígidos como los aloinjertos frescos, sin embargo pueden ser obtenidos de una forma más sencilla, otro ejemplo, es el aloinjerto liofilizado, el cual es el tipo de aloinjerto más abundante y el más utilizado para reparar o sustituir defectos en áreas vascularizadas donde el huésped puede facilitar suficientes factores osteoinductores nativos, por otra parte, los aloinjertos desmineralizados son utilizados para mejorar la cicatrización ósea en áreas donde es difícil lograr una cicatrización, ya que, este tipo de aloinjertos proporciona propiedades osteoinductivas (45,46,47).

### **Xenoinjertos**

Los xenoinjertos son tejidos de injertos obtenidos de un donante de una especie diferente a la especie receptora, es decir, de animales, este tipo de injerto es el más utilizado en el campo de la odontología, ya que es el que mayor se utiliza en procedimientos de regeneración periodontal, uno de los más conocidos por su nombre comercial es Bio-Oss, el cual es un hueso de origen bovino comercialmente procesado para producir una matriz mineral ósea inorgánica, uno de sus beneficios es la estructura porosa que se obtiene mediante su

procesamiento, ya que, es similar a la del hueso humano y es capaz de proporcionar un buen soporte mecánico sin embargo, este tipo de injerto al ser obtenido de otra especie no humana, requiere de un proceso de esterilización más estricto para poder eliminar el riesgo de transmisión de enfermedades, por lo que se podría reducir las propiedades osteoinductivas del injerto, además esto no elimina por completo el riesgo de transmisión de enfermedades, otras de sus desventajas es la respuesta inmunológica del tejido del huésped después de la implantación, la falta de células viables y la disminución de la osteoinducción como ya se había mencionado anteriormente, sin embargo, este tipo de injertos son menos costosos, su vida útil es generalmente más larga y se encuentran más disponibles debido a que la mayoría son obtenidos de porcinos, equinos y bovinos (38,42,43,47,48).

### **Materiales fitogénicos**

Los materiales fitogénicos son un tipo de sustitutos óseos los cuales son obtenidos de un origen vegetal como por ejemplo de corales y de algas marinas, tal y como el Gusuibu, el cual es una medicina tradicional china a base de hierbas que ha sido utilizado para reparar fracturas óseas y ha demostrado tener propiedades osteoinductoras y aumentar la actividad de la fosfatasa alcalina promoviendo los procesos de calcificación y remodelación ósea. Otro ejemplo de materiales fitogénicos es el uso de sustitutos óseos a base de coral, uno de los más conocidos es la hidroxiapatita coralina, la cual es un polímero natural de fosfato de calcio que ha sido utilizado para promover la regeneración del tejido óseo, ya que es capaz de proporcionar un andamio, sin embargo, uno de sus principales problemas es la fragilidad y la alta reabsorción, por lo tanto, este material es utilizado comúnmente en forma de gránulos o bloques tratando de mimetizar la estructura del hueso trabecular (38).

### **Materiales sintéticos**

Los materiales sintéticos también denominados aloplásticos son biomateriales de naturaleza inerte, no orgánicos, sintéticos, los cuales tienen algunos componentes químicos esenciales del tejido óseo, tales como, calcio y fosfato que están involucrados en promover la regeneración ósea, algunas de las ventajas y características que presentan este tipo de materiales son: la

biocompatibilidad, la calidad del producto estandarizado, la ausencia de riesgo de enfermedades infecciosas, las propiedades osteoconductoras y osteointegrativas, sin embargo, las propiedades osteoconductoras se ven alteradas debido a la composición del material y del método de fabricación, así como, sus propiedades mecánicas, estructura cristalina, tamaño de poro y porosidad, además, este tipo de materiales carecen de propiedades osteoinductivas y osteogénicas, siendo estas algunas de sus desventajas. Los materiales aloplásticos más utilizados son: la hidroxiapatita (HA), el fosfato tricálcico (TCP) y los vidrios bioactivos, asimismo, en este grupo también se incluyen los metales, como el níquel-titanio, diversos polímeros tales como, el polimetilmetacrilato (PMMA), las familias de ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y sus copolímeros, así como la policaprolactona (PCL) forman parte de este grupo de materiales (38,43,49).

### **Materiales compuestos**

Los materiales compuestos utilizados como sustitutos óseos son aquellos materiales que mezclan diferentes materiales, como por ejemplo, los cerámicos y los polímeros, ya que, al mezclar distintos materiales se pueden obtener diferentes propiedades estructurales y bioquímicas, lo que puede ser de gran ayuda para poder obtener características favorables para el desarrollo de sustitutos óseos compuestos, además, este tipo de materiales puede combinar dos o más materiales aprovechando las propiedades de cada uno de los materiales (39,50).

### **Sustitutos óseos basados en factores de crecimiento (GFBSs)**

Los sustitutos óseos basados en factores de crecimiento son materiales utilizados para rellenar o reparar defectos óseos, a los cuales, se les puede añadir diversos factores de crecimiento aumentando de esta forma su actividad biológica, puesto que, la mayoría de los sustitutos de injerto óseo como las cerámicas y los cementos sintéticos no presentan propiedades osteoinductoras, por lo tanto, estas propiedades son necesarias para la regeneración del tejido óseo, ya que, brindan ciertos beneficios, tales como, la capacidad de mejorar la consolidación ósea de los sustitutos óseos, facilitar la migración y unión de las células osteoprogenitoras y secretar diversos factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento (FG) son un componente importante en las distintas estrategias de regeneración de tejido óseo porque son capaces de proporcionar un microambiente osteogénico, además estas proteínas solubles se unen a sus receptores específicos en las superficies celulares desencadenando una serie de eventos que estimulan el destino y la actividad celular. En general, esta actividad se traduce en una proteína quinasa que desencadena una serie de eventos los cuales resultan en la transcripción del ácido ribonucleico mensajero (RNAm) y posteriormente en la formación de una proteína para su uso extracelular o intracelular (51,52,53).

Los injertos óseos basados en factores de crecimiento incluyen el uso de diversas hormonas y factores de crecimiento tanto naturales como recombinantes, los cuales son utilizados en conjunto con un medio portador y de soporte, como el colágeno, el cual proporciona propiedades mecánicas y osteogénicas mejoradas. Los factores de crecimiento más utilizados en la actualidad son: las Proteínas Morfogénicas Óseas (BMP), el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF-  $\beta$ ), el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), el Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 1 (IGF-1), el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF). Las BMP han mostrado tener resultados prometedores en el área odontológica para aplicaciones intraorales como en el aumento del seno maxilar y la preservación de la cresta alveolar, ya que, son capaces de fomentar la osteoinducción mediante su unión a receptores transmembranales específicos en osteoblastos, células troncales mesenquimales y condrocitos maduros, para posteriormente activar una cascada de eventos, la cual va a desencadenar la expresión de genes específicos relacionados con la diferenciación de los osteoblastos y la regeneración del tejido óseo, por lo tanto, las BMP más utilizadas para aplicaciones de regeneración ósea aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) son la BMP-2 y la BMP-7 (38,49,50).

## **Plasma rico en plaquetas (PRP)**

El plasma rico en plaquetas (PRP) puede definirse como un concentrado autólogo de plaquetas en un reducido volumen de plasma, el cual, contiene una fuente rica de factores de crecimiento autógenos, mitogénicos y quimiotácticos, tales como, el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- $\beta$ ), el Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 (FGF-2), el Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 1 (IGF-1), el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y el Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF), además, también contiene otro tipo de moléculas, tales como, citocinas, enzimas, péptidos, proteínas fibrinolíticas y proteínas antifibrinolíticas, las cuales son liberadas tras la activación plaquetaria a través de diversos factores de agregación plaquetaria, por ejemplo, colágeno, tromboxano, calcio, magnesio, serotonina, entre otros, también es importante mencionar que dicha activación plaquetaria puede lograrse mediante la vía mecánica. Tras la activación plaquetaria y la liberación de los factores de crecimiento, el concentrado plaquetario puede ser utilizado localmente, aumentando de esta forma la producción de células osteoprogenitoras, iniciando la actividad de los osteoblastos, estimulando el reclutamiento de células en el lugar del defecto y estimulando la angiogénesis, asimismo, las citocinas antiinflamatorias encontradas en el plasma rico en plaquetas, tales como, IL-4, IL-6 e IL-10 proporcionan propiedades antimicrobianas, reduciendo la incidencia de infección postoperatoria en la zona del defecto a reparar o rellenar, también se ha encontrado que existe una relación entre las concentraciones de plaquetas y las concentraciones de citocinas disponibles, por lo tanto, el número de plaquetas disponibles en el sitio del defecto aumenta la cantidad de citocinas, estimulando y acelerando el proceso de reparación. Otra de las moléculas de gran importancia que se encuentran en el componente plasmático del plasma rico en plaquetas son las proteínas adhesivas, como, por ejemplo, el fibrinógeno, la fibronectina, la vitronectina, la trombospondina-1 y la laminina-8, las cuales influyen en las interacciones célula-célula, adhesión celular, en la composición de la matriz extracelular (ECM), quimiotaxis y en el proceso de coagulación. Por lo general, el PRP se utiliza solo o en combinación con biomoléculas o andamios

como sustituto alternativo del injerto óseo, ya que, diversos resultados muestran una regeneración ósea más rápida y una mayor densidad mineral ósea en comparación con los autoinjertos utilizados, además, en una revisión actual se encontró información sobre el uso de PRP para defectos intraóseos, donde diversos estudios mostraron que la adición de PRP a un xenoinjerto mejoró la profundidad de sondaje y la pérdida de la inserción clínica en comparación con el uso del xenoinjerto solo, por lo tanto, es importante continuar investigando el uso del PRP en combinación con otros materiales (51,52,54).

### **Sustitutos óseos con células vivas**

Diversos tipos de células, tales como, células troncales mesenquimales, células estromales de la médula ósea, células del periostio, osteoblastos y células embrionarias, son utilizadas para regenerar el tejido óseo a través de la ingeniería de tejidos, ya que, estas células tienen la capacidad de formar tejido óseo de *novo* y de mejorar el proceso de regeneración ósea mediante la osteoconducción y osteogénesis, además, estas células son utilizadas en combinación con otros materiales que son utilizados como un soporte de andamiaje aumentando de esta forma la productividad de los sustitutos actuales de injertos óseos. En la actualidad, las células más utilizadas por su potencial terapéutico en la regeneración del tejido óseo y en la curación de fracturas son las células troncales mesenquimales (MSC), las cuales son células troncales adultas, no hematopoyéticas, multipotentes, que tienen una gran capacidad para diferenciarse en diversos linajes celulares, tales como, osteoblastos, condrocitos, miocitos y adipocitos, además, otra de sus ventajas es que las MSC pueden aislarse de diferentes tejidos, como por ejemplo, de la médula ósea, la membrana sinovial, el músculo esquelético y el tejido adiposo. Estudios han demostrado que los sustitutos óseos que se han utilizado en combinación con MSC mejoran la cicatrización, son capaces de diferenciarse en un linaje osteogénico y de regenerar grandes defectos óseos en comparación de un sustituto óseo solo, es decir, sin alguna combinación con MSC, sin embargo, existen algunas limitaciones como por ejemplo, la baja tasa de supervivencia de las células troncales mesenquimales después del trasplante, la necesidad de contar con las condiciones de almacenamiento especiales por debajo de  $-80^{\circ}\text{C}$ , la complejidad del proceso de fabricación y el alto costo, por esta razón, el uso

de sustitutos óseos en combinación con células troncales no es utilizado de forma rutinaria y se encuentra restringido en condiciones específicas (55,56).

### **Andamio**

En los últimos años, la ingeniería de tejidos (IT) ha surgido como una alternativa a las estrategias metodológicas más utilizadas para restaurar y reparar la función del tejido dañado, las cuales son, los autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos, siendo los más utilizados los autoinjertos los cuales presentan limitaciones ya que incluyen múltiples cirugías requeridas y la disponibilidad del tejido es limitada, por estas razones en la actualidad la IT se ha convertido en una nueva terapia potencial, además, es un campo relativamente nuevo, multidisciplinario cuyo objetivo principal es restaurar y mejorar la función de los tejidos perdidos o dañados mediante la preparación de andamios tridimensionales, sembrarlos con células y con factores de crecimiento. Sin embargo, a medida que progresa el campo de la IT existe una necesidad de crear andamios con biomateriales de primer nivel, reproducibles y de fácil acceso, los cuales se han convertido en un desafío primordial (18,57).

El término andamio se utiliza para denominar un biomaterial que proporciona un entorno y arquitectura adecuada para que las células regeneren tejidos y órganos, por lo tanto, un andamio puede describirse como una estructura artificial utilizada para soportar la formación de tejido tridimensional (3D), además, pueden ser sintéticos o naturales y se pueden utilizar como sistemas acelulares o como vehículos para células y/o fármacos, por lo tanto, otra de las posibilidades es el uso de andamios con moléculas solubles, tales como, antibióticos, factores de crecimiento o agentes quimioterapéuticos, los cuales pueden ser administrados en la zona del defecto para ejercer sus efectos terapéuticos y regenerativos (18,57,58).

Un andamio adecuado debe tener ciertas características que le permitan reparar los tejidos dañados, así como, reestablecer la función de los mismos, dentro de estas características se encuentran contar con requisitos suficientes, para el crecimiento celular, la proliferación, la vascularización, la biodegradabilidad, la biocompatibilidad y la integración del hospedador, además, la selección de un andamio para reparar un tejido u órgano específico va a depender de varias

consideraciones, tales como, el tipo de tejido a reparar, la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, las propiedades mecánicas, el método de fabricación y la arquitectura del andamio. Dentro de las características principales de los andamios utilizados en la IT es que deben ser capaces de mimetizar la matriz extracelular del tejido a reparar, por lo tanto, las características biológicas, mecánicas y arquitectónicas de los andamios deben ser similares a la de la matriz extracelular y sus funciones (57,59). Por lo tanto, en la Figura 2. Se puede observar un resumen de las características necesarias para la elaboración de andamios para la regeneración del tejido óseo, dentro de las características se encuentran los métodos de fabricación, la composición de los biomateriales, además de, los requerimientos biológicos y estructurales.

En la actualidad existen una gran diversidad de biomateriales como cerámicas, polímeros sintéticos y polímeros naturales los cuales son empleados para la fabricación de andamios mediante distintas técnicas de fabricación. Algunos de los polímeros sintéticos más utilizados son el ácido poli-L-láctico (PLLA), el ácido poli-DL-láctido-co-glicólico (PLGA), el ácido poliglicólico (PGA) y la policaprolactona (PCL) los cuales han sido utilizados para la fabricación de andamios, ya que, en la actualidad los polímeros sintéticos son utilizados en el área biomédica por las propiedades que ofrecen, por ejemplo, la porosidad, el tiempo de degradación y sus propiedades mecánicas, las cuales pueden ser adaptadas para diversas aplicaciones médicas. Otro de los grandes beneficios que ofrecen los polímeros sintéticos es que son más económicos en comparación con los polímeros naturales, ya que, pueden ser producidos en grandes cantidades de manera uniforme con un largo periodo de conservación, además, están disponibles de manera comercial ya que presentan propiedades fisicoquímicas y mecánicas similares a la de distintos tejidos. Por otro lado, los polímeros naturales utilizados para la fabricación de andamios tienen la ventaja de tener una excelente adhesión celular y de ser biológicamente más activos en comparación con los biomateriales sintéticos, por lo tanto, los biomateriales naturales más utilizados son: el colágeno, los sustratos a base de alginato, los proteoglicanos y el quitosano. Otro de los materiales utilizados para la fabricación de andamios son las cerámicas, las cuales tiene características como ser bioactivo, biocompatible y biodegradable, algunos ejemplos más comunes de



biocerámicos utilizados en la IT son: la hidroxiapatita (HA), el fosfato tricálcico (TCP), el fosfato de calcio bifásico (BCP) combinado con hidroxiapatita (HA) y los vidrios bioactivos, los cuales han sido utilizados en su mayoría como materiales de reparación de tejidos duros y de rellenos óseos, sin embargo una de sus desventajas es que son frágiles y difícil de moldear (57,59,60).



Figura 2. Esquema con las características necesarias para la fabricación de un andamio para la regeneración del tejido óseo. Fuente propia.

## II.- Antecedentes

### 2.1 Ingeniería de Tejidos (IT)

La ingeniería de tejidos (IT) surgió hace aproximadamente 30 años como un método alternativo para la regeneración de tejidos y órganos, así como la restauración de la función, a través de implantar células y/o biomoléculas dentro de una matriz o andamio, además, la IT es un campo relativamente nuevo,

multidisciplinario, el cual combina las ciencias básicas como por ejemplo la ciencia de los materiales con la biomecánica, biología celular y las ciencias de las médicas para poder llevar a cabo la reparación, reconstrucción y restauración de la función de los tejidos y órganos dañados. En el área odontológica, los defectos óseos son afecciones que oscilan desde recesiones que miden milímetros hasta la resección completa de la mandíbula, siendo tratadas, por ejemplo, con hueso liofilizado, membranas o prótesis metálicas, que en la mayoría de los casos devuelven la función de manera limitada, por esta razón la IT se ha convertido en una nueva terapia potencial, la cual, se basa en el uso de andamios tridimensionales (3D) como plantillas, sembrarlos con células y con factores de crecimiento. Estas tres estrategias metodológicas se conocen como la triada de la ingeniería de tejidos, por lo tanto, estos tres componentes se pueden definir como: 1) Un andamio el cual proporciona estructura y sustrato para el crecimiento y desarrollo del tejido. 2) Una fuente de células para facilitar la formación de tejido. 3) Factores de crecimiento o estímulos biofísicos para dirigir el crecimiento y la diferenciación de las células dentro del andamio. Sin embargo, a medida que progresa el campo de la IT existe una necesidad de crear andamios con biomateriales de primer nivel, reproducibles y de fácil acceso, los cuales se han convertido en un desafío primordial (34,61,62).

Entre los tejidos más resistentes, pero también más propensos a ser lesionados o destruidos, se encuentra el tejido óseo, por esta razón los trabajos de investigación sobre la reparación de defectos óseos comenzaron hace algunos años, además, debido a las propiedades regenerativas del hueso, los defectos óseos pequeños pueden regenerarse espontáneamente, sin embargo, los defectos denominados de tamaño crítico, los cuales son causados por diversos factores tales como, traumatismos, trastornos genéticos, reabsorción ósea asociada a tumores benignos o malignos, entre otros, requieren de una intervención quirúrgica para implantar materiales que aceleren y orienten el proceso de regeneración, sin embargo, los tratamientos más utilizados para reparar este tipo de defectos óseos presentan limitaciones, de modo que, la ingeniería de tejido óseo (BTE) busca crear andamios 3D capaces de inducir la formación de tejido óseo mediante la activación de una serie de eventos asociados con la regeneración y formación del tejido óseo. Estos andamios 3D

deben cumplir con ciertas características para que las células puedan adherirse, crecer y diferenciarse, por lo tanto, deben ser biocompatibles, biodegradables y deben cumplir con ciertas propiedades superficiales adecuadas y porosidad, además, los andamios 3D también deben tener propiedades osteoinductoras y osteoconductoras para reclutar células osteoprogenitoras en la zona del defecto óseo y de esta forma mandar las señales adecuadas para su diferenciación (18,63,64).

## 2.2 Andamios para la regeneración del tejido óseo

El término andamio se utiliza para denominar un biomaterial que proporciona un entorno y arquitectura adecuada para que las células puedan adherirse, crecer y diferenciarse con el objetivo de imitar a la matriz extracelular (ECM), estos pueden ser sintéticos o naturales y pueden ser utilizados como sistemas acelulares o vehículos para células y/o fármacos, los cuales pueden ser administrados en la zona del defecto para ejercer sus efectos terapéuticos y regenerativos (18,57,58).

El tejido óseo comúnmente denominado hueso es un tejido conectivo especializado que tiene una estructura jerárquica y compleja con funciones mecánicas, biológicas y químicas, por esta razón un andamio para la regeneración del tejido óseo debe cumplir con ciertos requisitos (65).

- **Arquitectura:** Un andamio debe tener una estructura suficientemente porosa para que haya una adecuada adhesión celular, transferencia de nutrientes, vascularización, formación de tejido nuevo y remodelación, para facilitar la integración del tejido del huésped, sin comprometer la estabilidad mecánica del andamio (66).
- **Biocompatibilidad:** Un andamio es un biomaterial que proporciona un soporte adecuado para que las células aplicadas de forma externa o endógenas se adhieran, crezcan y se diferencien, por lo tanto, los biomateriales utilizados para la fabricación de los andamios deben ser compatibles con las células endógenas del tejido del huésped, así como, con los componentes celulares de los tejidos diseñados, mostrando ausencia de toxicidad y reacciones inflamatorias (64).

- **Bioreabsorbible:** Los biomateriales utilizados para la fabricación de andamios deben tener la capacidad de ser reemplazados por tejido óseo nuevo, a una velocidad similar a la del crecimiento del hueso nuevo, mostrando una tasa de reabsorción controlada, generando espacio adecuado para el crecimiento del tejido óseo (67).
- **Propiedades mecánicas:** Un andamio fabricado para la regeneración del tejido óseo debe tener propiedades mecánicas similares a la del tejido óseo a reparar, ya que, varían ampliamente desde el hueso esponjoso hasta el hueso cortical, estas propiedades mecánicas incluyen, el módulo de Young, la resistencia a la compresión y la resistencia a la tracción. Por ejemplo, el módulo de Young del hueso cortical tiene entre 7 y 30 GPa, mientras que el del hueso esponjoso esta entre 0.1 y 2 GPa, además el hueso cortical presenta una resistencia a la compresión entre 100 y 230 MPa, mientras que la del hueso esponjoso esta entre 2 y 20 MPa. Por lo tanto, las grandes variaciones que existen en las propiedades mecánicas hacen que se complique diseñar un andamio ideal para reparar defectos óseos (66,68).
- **Porosidad:** Es una propiedad muy importante que debe tener un andamio para la regeneración del tejido óseo, esta propiedad depende del volumen del poro, tamaño del poro, forma, orientación y la interconectividad que existe entre los poros del andamio. Esta propiedad ayuda a que exista la migración y proliferación celular proporcionado un entorno adecuado para la transferencia de nutrientes a las estructuras adyacentes al andamio, también los andamios porosos posibilitan el crecimiento celular, la vascularización y la distribución celular de forma uniforme. La porosidad promedio de un andamio esta entre el 50 % al 90% y el tamaño de poros se encuentra entre 150  $\mu\text{m}$  a los 600  $\mu\text{m}$ , esto va a depender del tipo de hueso que se desea reparar (69,70).

### **2.3 Técnicas para la fabricación de andamios 3D para regeneración ósea**

En la actualidad existen varios métodos de fabricación de andamios en tercera dimensión 3D para la regeneración del tejido óseo, como por ejemplo, el electrohilado, el espumado con gas, la separación de fases inducida

térmicamente, la fabricación aditiva, entre otras. Sin embargo, presentan ciertas limitaciones en comparación con la técnica de lixiviación de partículas y fundición de disolventes, la cual, presenta ciertas ventajas, tales como, tener un adecuado control del tamaño del poro, una buena interconectividad de los poros y una gran porosidad, lo que beneficiará a las células, ya que, podrán crecer, proliferar y diferenciarse adecuadamente dentro del andamio para posteriormente regenerar la zona del defecto óseo.

### **Fundición por congelación**

Es uno de los métodos de fabricación de andamios porosos para la regeneración del tejido óseo, ya que se pueden utilizar una amplia gama de materiales cerámicos y poliméricos. En esta técnica de fabricación, la suspensión del material principal se hace con un vehículo de congelación, posteriormente, la suspensión se congela a determinadas condiciones, seguido de la sublimación del vehículo de congelación, dando como resultado la formación de un andamio poroso. Este andamio se sintetiza a una temperatura la cual dependen de las propiedades térmicas del material principal. En la actualidad, esta técnica solo es capaz de fabricar andamios macroporosos anisotrópicos con un tamaño de poro y una porosidad homogénea en toda la estructura del andamio. Algunas de las ventajas que presenta este método de fabricación de andamios porosos es que el costo de fabricación es bajo, se pueden utilizar una amplia gama de materiales y el proceso de fabricación es relativamente simple (71).

### **Liofilización**

Es una técnica relativamente simple la cual puede ser utilizada con polímeros naturales, como por ejemplo, el colágeno, además, también puede ser utilizada con polímeros sintéticos como el ácido poli-L-láctico (PLLA). En este proceso, se prepara una solución a una concentración deseada de polímero y disolvente, posteriormente, el solvente se elimina congelando la solución a muy baja temperatura, mientras que, la fase acuosa es eliminada mediante sublimación dando como resultado la formación de un andamio con alta porosidad e interconectividad de poros. El tamaño de los poros puede controlarse ajustando la velocidad de congelación y el pH de la solución, la cantidad de agua, el tamaño de los cristales de hielo del disolvente y la concentración del polímero. Una de

las características de esta técnica de fabricación es que los andamios resultantes son muy porosos, mostrando una porosidad de alrededor del 90%, además, los poros se encuentran muy interconectados, sin embargo, también existen algunas desventajas durante su procesamiento, tales como, un mayor tiempo para su procesamiento, un alto consumo de energía, el uso de solventes citotóxicos y la generación de poros de forma irregular y de tamaño pequeño de alrededor de 15  $\mu\text{m}$  a 35  $\mu\text{m}$  (72,73).

### **Espuma con gas**

Es un método el cual evita el uso de disolventes, por lo tanto, es una buena técnica para incorporar moléculas sensibles en andamios sin reducir su bioactividad. Se utiliza dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) o nitrógeno a alta presión para poder infiltrarse en el polímero, generando poros en el andamio, además, estos gases tienen las características de ser poco tóxicos y no inflamables. Algunas de las ventajas que presenta este método para la fabricación de andamios son, la ausencia de disolventes permitiendo incorporar moléculas bioactivas, el método de fabricación es muy sencillo y económico para fabricar andamios porosos 3D. Asimismo, este método genera una espuma muy porosa, con un tamaño de poro de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  y con una porosidad del 93%, sin embargo, la interconectividad entre los poros es baja, por lo tanto, para poder mejorar la interconectividad entre los poros, esta técnica, se ha utilizado en conjunto con la técnica de lixiviación de partículas generando una mejor interconectividad. Otra de sus desventajas es que no se pueden emplear polímeros hidrófilos y vítreos debido a su baja solubilidad en  $\text{CO}_2$  (74,75).

### **Separación de fases inducida térmicamente**

Es una técnica simple y es la más utilizada para la separación de fases. Este método consiste en disminuir la temperatura de la solución polimérica hasta inducir la separación de fases, la cual consiste, en tener una fase con una alta concentración de polímero y otra fase con baja concentración del mismo. Posteriormente se retira el disolvente por medio de evaporación, extracción o sublimación, por lo tanto, el espacio que estaba ocupado por el disolvente genera una porosidad homogénea en el andamio. Asimismo, la morfología de los poros, las propiedades mecánicas, la bioactividad y la velocidad de degradación van a

depender del disolvente, la concentración del polímero y la temperatura. Algunas de las ventajas de este método de fabricación son, se pueden integrar moléculas bioactivas dentro del material cuando se disminuye la temperatura, además, esta técnica tiene la capacidad de generar un andamio con interconectividad entre sus poros y también es una técnica sencilla y rápida. Otro aspecto muy importante es que en función de las condiciones de separación se pueden obtener andamios con diferentes morfologías y características, como por ejemplo, poros cerrados o abiertos, estructura fibrosa, entre otras. Sin embargo algunas de sus desventajas es el uso de agentes citotóxicos para mezclar el polímero, además, la técnica está limitada al uso de pocos polímeros (74,76).

### **Sol-gel**

El método de solución-gelificación es una técnica muy buena para la síntesis de nanopartículas y nano-composites. Consiste en la preparación de una solución y una sucesiva gelificación para posteriormente eliminar el solvente. Como resultado se obtienen andamios porosos, con una gran conectividad entre ellos. Dentro de las ventajas que tiene este método se encuentran, la diversidad de materiales que se pueden emplear con esta técnica, su bajo costo, es una técnica fácil de emplear, con la cual se pueden obtener andamios homogéneos con una porosidad controlada, buena estabilidad química y térmica, buena resistencia mecánica, además, esta técnica deja que se lleve a cabo la síntesis directa de materiales multicomponentes de alta pureza sin el uso de productos intermedios o técnicas de procesamiento que elevan el costo. Sin embargo, algunas de sus desventajas incluyen el alto costo de las materias primas y la contracción que se genera durante el procesamiento (77,78).

### **Electrohilado**

Es una técnica que permite la creación de micro y nano fibras a través de un chorro de solución polimérica sintética o natural, la cual esta eléctricamente cargada o también se puede a través de un polímero en estado fundido. Sin embargo, de acuerdo a la poca estabilidad de los polímeros naturales y lo tóxico de los productos de los polímeros sintéticos, se utiliza una combinación de ambos materiales. Un sistema de electrohilado consiste en cuatro componentes, como se puede observar en la Figura 3., los cuales son:

1) Un rotor con una bomba de jeringa. 2) Una aguja metálica. 3) Una fuente de alimentación de alto voltaje. 4) Un conector conectado a tierra. Esta técnica implica el bombeo de una solución polimérica a través de la punta de la aguja, la cual es colocada a una distancia contraria al colector conectado a tierra, por lo tanto, el chorro del líquido se extiende y por medio de repulsión electrostática se forman bucles de expansión hasta ser depositados en el colector conectado a tierra. Por lo tanto, las fibras producidas mediante esta técnica serán denominadas electrospun, las cuales van a crear andamios que mimetizan a la matriz extracelular, ayudando a tener una buena adhesión y desarrollo celular. El resultado de la técnica es una red tridimensional (3D) de fibras, las cuales van a generar una superficie porosa e interconectada y pueden ser controladas mediante la concentración del polímero y el ajuste del dispositivo de electrohilado. Este método de fabricación de andamios porosos 3D es un método simple y rápido, sin embargo, una de sus desventajas es que no hay una distribución homogénea de poros, por los que su aplicación se ve limitada (74,79).

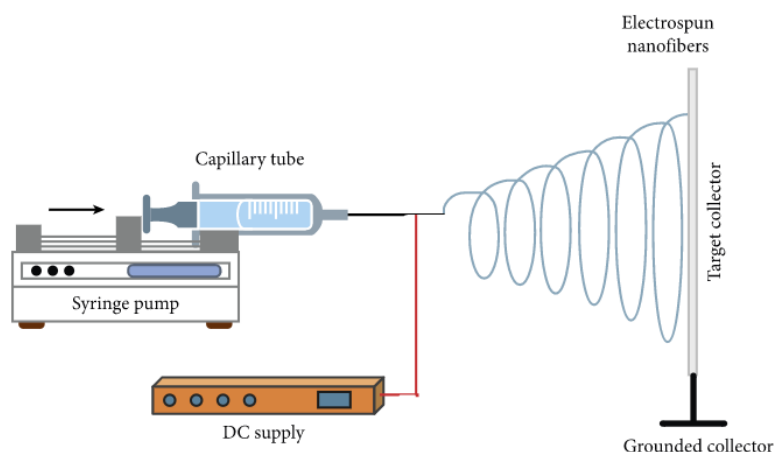


Figura 3. Descripción esquemática de la técnica de electrohilado. Imagen tomada de Abdalla *et.al* (74).

### Fabricación aditiva (AM)

La fabricación aditiva (AM) es un método de procesamiento el cual concede un control completo sobre la microarquitectura y forma del andamio, permitiendo una reproducibilidad mejorada. Además, este método es idóneo para fabricar



andamios complejos sin el uso de otras herramientas o moldes. Dentro de los métodos de procesamiento de la fabricación aditiva (AM), se encuentran, la sinterización selectiva por láser (SLS), la extrusión por fusión o el modelado por deposición fundida (FDM) y la impresión tridimensional (3DP). Todas estas técnicas consisten en la obtención de una composición capa a capa a partir de un modelo de diseño asistido por computadora tridimensional (CAD), el cual logra una gran precisión, resolución y reproducibilidad. Dentro de las ventajas que presentan los andamios producidos por AM es que tienen una estructura totalmente controlada, también tienen una red porosa más del 90%, la cual está interconectada y además, son completamente reproducibles. Una de sus desventajas es que en la actualidad no existe un estándar de diseño definido para el diseño de andamios óseos, ya que, el diseño del andamio va a depender de la zona del defecto a reparar (80,81).

### **Lixiviación de partículas y fundición de disolventes**

Es una técnica sencilla, de fácil reproducción, viable, de bajo costo, la cual se utiliza para generar andamios tridimensionales 3D porosos e interconectados, este método implica en mezclar un porógeno soluble en agua, como por ejemplo, la sal, en una solución polimérica, tal y como se puede observar en la Figura 4., la cual se preparó previamente disolviendo el polímero en un disolvente orgánico, posteriormente la mezcla se cuele en un molde y el disolvente es eliminado mediante secado al vacío y liofilización. Finalmente, las partículas del porógeno se lixivian con agua para poder obtener una estructura porosa. Este método tiene como características, un adecuado control del tamaño del poro, una buena interconectividad de los poros y una gran porosidad de alrededor del 50% al 90% por la cantidad y el tamaño del porógeno agregado, además, se pueden utilizar una gran cantidad de biopolímeros, tanto naturales como sintéticos, por ejemplo, dentro de los polímeros naturales más utilizados están, el ácido hialurónico (HyA), el colágeno, el alginato, entre otros, mientras que dentro de los polímeros sintéticos podemos encontrar, el polietilenglicol (PEG), el poli (ácido láctico) (PLA), el poli (ácido glicólico) (PGA), la policaprolactona (PCL), entre otros. Por otro lado, en la literatura se ha mencionado que se han utilizado distintos tipos de porógenos tales como, la sal, el azúcar, distintos polímeros, entre otros, los cuales van a fomentar una estructura macro o microporosa en el andamio,

además estas partículas de porógeno son las encargadas promover el tamaño de los poros, la interconectividad de los poros, la morfología de los poros y la porosidad del andamio. Estas características hacen que los andamios fabricados mediante esta técnica tengan micro o macroestructuras con poros orientados, permitiendo la adhesión, migración y proliferación celular, por lo tanto los andamios fabricados mediante esta técnica son adecuados para aplicaciones en tejido óseo, asimismo, varios investigadores han fabricado andamios mediante esta técnica utilizando una combinación de polímeros e integrando compuestos bioactivos favoreciendo la función del andamio (18,82,83).

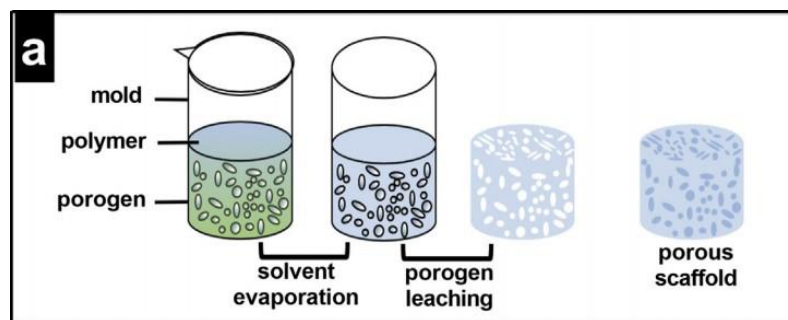


Figura 4. Descripción esquemática de la técnica de lixiviación de partículas y fundición de disolventes. Imagen tomada de Naghmeh *et al.* (100).

### 3.- Biopolímeros

Los biomateriales son clasificados conforme a su origen, en sintéticos o naturales, los sintéticos son los que se obtienen por medio de reacciones químicas y en el caso de los polímeros se obtienen a partir de su correspondiente monómero, mientras que, los naturales son los que se obtienen a partir de una fuente que se encuentra en la naturaleza. Entre los distintos materiales que existen, los biopolímeros son utilizados en la ingeniería de tejidos para la fabricación de andamios, debido a sus características tales como, biodegradabilidad, biocompatibilidad y fácil procesamiento, estos pueden ser naturales o sintéticos y pueden ser utilizados solos o combinados en la ingeniería de tejidos (18,84). Por lo tanto, en la Tabla 1. Se pueden observar las principales ventajas y desventajas de los polímeros, así como, algunos ejemplos sobre su origen.

Tipo	Ventajas	Desventajas	Ejemplos de Origen
<b>Sintético</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tienen la capacidad de imitar las propiedades estructurales y mecánicas de la matriz extracelular.</li> <li>Se pueden controlar las propiedades estructurales, mecánicas, fisicoquímicas y degradación.</li> <li>Son bioinertes.</li> <li>Fácil procesamiento.</li> <li>Son de bajo costo.</li> <li>Se pueden producir en grandes cantidades.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Puede haber Inmunogenicidad.</li> <li>Las propiedades mecánicas son difíciles de controlar.</li> <li>La biodegradabilidad es difícil de controlar.</li> <li>Uso de disolventes tóxicos para su preparación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se obtienen de su correspondiente monómero por ejemplo:</li> <li>Poliésteres</li> <li>Poliuretanos</li> </ul>
<b>Natural</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Favorecen la adhesión celular por medio de las proteínas adhesivas.</li> <li>Tienen una mejor interacción con las células.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Su procesamiento es complejo.</li> <li>Carecen de óptimas propiedades mecánicas.</li> <li>No se pueden reproducir en grandes cantidades.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plantas</li> <li>Algas</li> <li>Animales</li> <li>Microorganismos</li> </ul>

Tabla 1. Las principales ventajas y desventajas de los polímeros. Fuente propia.

### 3.1 Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)

Los polímeros sintéticos en la actualidad en la actualidad son utilizados en el área biomédica por las propiedades que ofrecen como, por ejemplo, porosidad, degradación, propiedades mecánicas, las cuales pueden ser adaptadas para diversos usos en aplicaciones médicas. Otro de los grandes beneficios que ofrecen los polímeros sintéticos es que son más económicos que los polímeros naturales, además, pueden ser producidos en grandes cantidades de manera uniforme presentando un largo periodo de conservación además, se encuentran disponibles de manera comercial ya que muestran propiedades fisicoquímicas y mecánicas comparables a la de distintos tejidos. Uno de los polímeros sintéticos

más utilizados para aplicaciones biomédicas en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa es el poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), el cual es un poliéster alifático lineal adquirido por medio de la polimerización por apertura de anillo de monómeros de  $\epsilon$ -caprolactona, que puede proceder mediante mecanismos de polimerización catiónica, aniónica, de coordinación o de radicales. Existen distintos métodos de polimerización de caprolactona los cuales emplearon distintos catalizadores como el octoato estannoso o los alcóxidos de aluminio, estas reacciones se llevaron a cabo en distintas condiciones como, la duración de la polimerización, la temperatura, la presencia de distintos tipos y concentraciones de catalizadores, relación de monómero-disolvente, entre otros, al modificar estas variables se pudo elaborar PCL con distintos pesos moleculares ( $M_n$ ) e índices de polidispersidad (PDI) (74,85).

### **Características del PCL**

El PCL es un polímero sintético, biocompatible, termoplástico, semicristalino, biodegradable, no tóxico, el cual es utilizado en el diseño de andamios debido a su aprobación por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), además, se ha utilizado en procesos regenerativos de hueso, de cartílago, en suturas quirúrgicas y en sistemas de administración de fármacos. Entre las características de PCL se encuentran que es un polímero estable, económico, fácil de conseguir y de alta calidad al momento de sintetizar andamios. Dentro de sus propiedades fisicoquímicas su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) es aproximadamente  $-60^\circ\text{C}$  y la temperatura de fusión de los cristales ( $T_m$ ) de  $60^\circ\text{C}$ , otra de las propiedades del PCL es el % de cristalinidad con un 67%, además, una característica muy importante del PCL es que tiene la tasa de degradación del material más baja en comparación con otros polímeros sintéticos, esta propiedad de degradación depende de las condiciones de preparación y las propiedades del andamio, pero en general, la degradación completa de este polímero tarda de 2 a 3 años aproximadamente en el medio biológico, además, es excretado por vía renal y no se acumula en el cuerpo (86). Otras características fisicoquímicas importantes del PCL pueden observarse en la Tabla 2.

Propiedades fisicoquímicas del PCL	
Densidad ( $\rho/\text{cm}^{-3}$ )	1.11
Peso molecular promedio ( $M_n/\text{g mol}^{-1}$ )	530-630 000
Solubilidad	Altamente soluble en benceno, cloroformo, diclorometano y tolueno a temperatura ambiente. Ligeramente soluble en acetona, 2-butanona, dimetilformamida y acetonitrilo. Insoluble en agua, alcoholes, éter dietílico.
Punto de fusión ( $T_m$ ) y transición vítrea ( $T_g$ )	$T_m = 65^\circ \text{C}$ , $T_g = -65^\circ \text{C}$ to $-61^\circ \text{C}$
Cristalinidad (%)	67
Módulo (MPa)	190
Alargamiento a la rotura (%)	>500
Esfuerzo máximo (Mpa)	14
Permeabilidad al agua a $25^\circ \text{C}$ ( $\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ )	177
Tensión superficial (g) en mN/m	51

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL).

Imagen tomada de Debasish *et al* (86).

### III.- Justificación

Debido a diversos factores etiológicos que están involucrados en la pérdida o daño óseo que incluyen la enfermedad periodontal, la atrofia del hueso relacionada con diferentes síndromes, lesiones traumáticas, reabsorción ósea asociada a tumores benignos o malignos, entre otros, las estrategias metodológicas actuales más utilizadas para tratar los defectos óseos son los injertos, tales como: autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos e injertos aloplásticos, siendo los más utilizados los autoinjertos, los cuales presentan ciertas limitaciones, ya que, requieren de múltiples cirugías las cuales están asociadas a diversos riesgos tales como, sangrado, inflamación, infección y dolor crónico, además, la cantidad de tejido que se obtiene para reparar el defecto óseo es limitada, lo cual no sería funcional para tratar defectos óseos extensos, por lo tanto, la reconstrucción constituye un gran desafío.

Es por eso que la ingeniería de tejidos, sigue investigando nuevas alternativas para estos tratamientos, uno de ellos es la fabricación de andamios porosos de PCL por medio de la técnica de lixiviación de partículas y fundición de disolventes, en la cual se utilizará como porógeno la sal. Los andamios fabricados por medio de esta técnica proporcionan una estructura y entorno adecuado para que las células regeneren tejido óseo, ya que, cuenta con el tamaño de poro, porosidad e interconectividad adecuada lo cual permitirá la adhesión, proliferación y diferenciación celular, así como, una adecuada difusión de nutrientes a través de los poros proporcionando el crecimiento del tejido óseo en el andamio, además, la red porosa que se forma en el andamio imita la arquitectura de la matriz extracelular ósea generando una interacción efectiva de las células con su entorno.

#### **IV.- Planteamiento del problema**

Considerando lo anterior, el diseño, fabricación y caracterización de andamios de PCL porosos por medio de la técnica de lixiviación de sal, permite tener un tamaño de poro y una porosidad adecuada, así como, una mayor interconectividad entre los poros generando un andamio con la estructura apropiada semejante a la de la matriz extracelular ósea, lo cual permitirá la adhesión, proliferación, diferenciación y migración celular, con la intención de regenerar la zona del defecto de una manera eficaz, con la cantidad y calidad de tejido de *novo* adecuada similar al hueso nativo.

#### **Pregunta de investigación**

¿ Los andamios porosos de PCL fabricados por medio de la técnica de lixiviación de sal, llevará a la formación adecuada de poros, lo que generará una mayor interconectividad en el andamio y por consiguiente una mejor estructura 3D para la regeneración de tejido óseo?

#### **V.- Hipótesis**

Los andamios 3D fabricados de PCL por medio de la técnica de lixiviación de partículas y fundición de disolventes promueven la formación de poros con las características adecuadas para la regeneración del tejido óseo.

## VI.- Objetivos

### Objetivo General

Determinar la formación de poros, así como la interconectividad dentro del andamio de PCL fabricado por medio de la técnica de lixiviación de sal.

### Objetivos Específicos

- 1.- Sintetizar andamios de PCL por medio de la técnica de lixiviación de sal.
- 2.- Caracterizar las propiedades estructurales de los andamios de PCL por SEM.

## VII.- Metodología y diseño

Tipo de estudio	Experimental y prospectivo
<b>Universo de estudio <i>in vitro</i></b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 12 andamios de PCL fabricados mediante la técnica de lixiviación de sal bajo cuatro distintas condiciones de secado y de congelamiento.</li><li>• 3 andamios de PCL fabricados mediante la técnica de lixiviación de sal para cada grupo con una condición diferente.</li><li>• 1 andamio de cada grupo fue seleccionado aleatoriamente para poder obtener las imágenes de SEM.</li><li>• 23 andamios de PCL fabricados mediante la técnica de lixiviación de sal para el grupo número 2.</li><li>• 3 andamios del grupo 2 fueron seleccionados aleatoriamente para poder obtener las imágenes de SEM.</li></ul>
<b>Criterios de inclusión <i>in vitro</i></b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Andamios de PCL fabricados mediante la técnica de lixiviación de sal con los mismos parámetros de fabricación para las distintas condiciones de secado y de congelamiento.</li></ul>
<b>Criterios de exclusión <i>in vitro</i></b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Andamios de PCL que no cumplan con los parámetros de fabricación establecidos para las distintas condiciones de secado y de congelamiento.</li></ul>

<b>Variables <i>in vitro</i></b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Escala de medición</b>
Grupo1	Constructo 3D fabricado mediante la técnica de lixiviación de sal bajo 2h de secado.	Cualitativa, nominal
Grupo 2	Constructo 3D fabricado mediante la técnica de lixiviación de sal bajo 24h de secado.	Cualitativa, nominal
Grupo 3	Constructo 3D fabricado mediante la técnica de lixiviación de sal bajo 24 h de congelamiento y 2 h de secado.	Cualitativa, nominal
Grupo 4	Constructo 3D fabricado mediante la técnica de lixiviación de sal bajo 24h de congelamiento, 2 h de secado y 5 ciclos de congelar 1 h y descongelar 30 min.	Cualitativa, nominal
Tamaño de poro	Diámetro más grande que se observa dentro del canal de poros.	Cuantitativa, continua



### A) Síntesis de los andamios de PCL

Se utilizó 15 % de PCL con una masa de 80 kDa el cual fue adquirido en Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Después para preparar la solución polimérica se pesaron 2.63 g de PCL en un contenedor de vidrio para ser mezclados con 10 mL de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) durante 1 día en el agitador magnético.

Posteriormente se pesaron 3.5 g de la solución de 15% de PCL en un contenedor de vidrio y se adicionaron 7 g de cloruro de sodio (NaCl) con un tamaño de cristales de 250-425  $\mu\text{m}$  para luego ser mezclados en un vaso de precipitado hasta formar una pasta homogénea. Una vez formada la pasta, se vertió en moldes de teflón de 9 mm de diámetro utilizando un pistón para compactar la pasta de PCL y poder formar los andamios. Luego, se enumeraron los moldes del número 1 al 4 para así poder identificar los distintos grupos que se formaron, ya que, se colocaron bajo diferentes condiciones de secado y congelamiento como se muestra en la Tabla 3.

Para la etapa de las distintas condiciones en las cuales se pusieron los andamios, el proceso de congelamiento se realizó colocando los andamios en un recipiente el cual fue introducido al ultracongelador, posteriormente se realizó el proceso de secado colocando los andamios en un vaso de precipitado para que el cloroformo se evaporará a temperatura ambiente.

Grupo	Tiempo congelamiento (h)	Tiempo de secado (h)	Intervalos de congelamiento
1	Ninguno	2	Ninguno
2	Ninguno	24	Ninguno
3	24 h	2	Ninguno
4	24 h	2	5 ciclos de congelar 1 hora y descongelar 30 min

Tabla 3. Distribución de los grupos de la síntesis de los andamios de PCL bajo distintas condiciones.

Después de haber dividido los andamios en distintos grupos con distintas condiciones, estos se colocaron en un contenedor de vidrio con etanol y se dejaron durante 30 min, además, se volvieron a etiquetar los andamios para ser identificados y se colocaron en un contenedor de vidrio con agua bidestilada, la cual se cambió cada 24 h durante 5 días para poder remover el NaCl lentamente, además, con el cambio del agua bidestilada el NaCl se disuelve y se forman los poros interconectados en el andamio 3D de PCL. Finalmente, después de los 5 días, los andamios de PCL se sometieron al proceso de liofilización para retirar el exceso de agua, al final, los andamios porosos de PCL se sacaron de los moldes de teflón y se recortaron a 2 mm de ancho, por lo tanto, las medidas finales del andamio de PCL que se obtuvieron fueron de 9 mm de diámetro x 2 mm de espesor. Asimismo, todos los procedimientos realizados se pueden observar en la Figura 5. La cual representa un esquema de la síntesis de los andamios de PCL mediante la técnica lixiviación de partículas y fundición de disolventes.

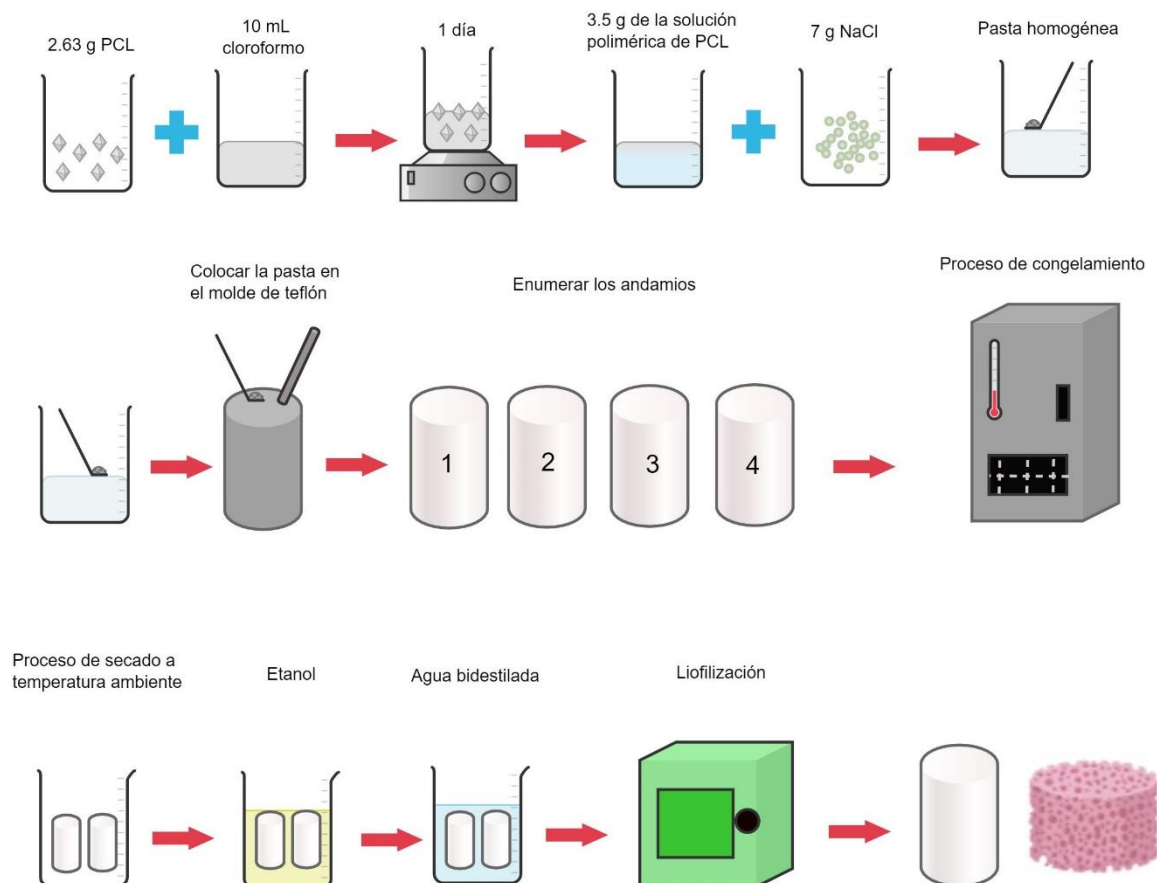


Figura 5. Esquema de la síntesis de los andamios de PCL por medio de la técnica lixiviación de partículas y fundición de disolventes.

## **B) Caracterización de los andamios de PCL**

Para poder realizar el análisis de la microestructura de los andamios de PCL se tomaron imágenes por medio de microscopia electrónica de barrido (SEM) en el Instituto de Física de la UNAM, se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido de bajo vacío (SEM 5600LV) a un voltaje de 10 kV y 15 kV para poder observar la superficie de los andamios. Las muestras de los cuatro grupos fueron recubiertas con oro antes del análisis para posteriormente obtener las imágenes de SEM y así poder realizar el análisis la superficie de los andamios. Además, después de haber seleccionado el grupo con las mejores características estructurales por medio de SEM, el cual, fue el grupo número 2, las muestras se volvieron a preparar para poder ser analizadas. Posteriormente, se utilizó el software Image J. para analizar el tamaño de los poros a partir de las imágenes de SEM a ( 50X ) El tamaño promedio de los poros se obtuvo midiendo por triplicado el diámetro de todos ellos en los andamios del grupo 2, los cuales, obtuvieron las mejores características estructurales. Cabe mencionar que también se obtuvo información de los distintos grupos sintetizados a través de diferentes condiciones, en estos grupos, únicamente se obtuvieron los máximos y mínimos del tamaño de los poros en las micrografías con un aumento ( 100X ).

## **VIII.- Resultados**

### **Fabricación de andamios de PCL por medio de la técnica de lixiviación de sal**

Se realizó la fabricación de los andamios de PCL por medio de la técnica de lixiviación de sal de acuerdo a la metodología descrita anteriormente y se obtuvieron 12 andamios en total, 4 andamios para cada condición descrita anteriormente, así como se puede observar en la Figura 6. Las medidas finales para cada andamio fueron de 9 mm de diámetro x 2 mm de espesor.



Figura 6. Andamios de PCL fabricados por medio de la técnica de lixiviación de sal de acuerdo, clasificados en cuatro grupos de acuerdo a las 4 condiciones descritas.

## A) Caracterización superficial del andamio de PCL

Para poder analizar la superficie de los andamios correspondientes a cada una de las condiciones, se tomaron imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM) en el Instituto de Física de la UNAM. Se obtuvieron cuatro imágenes de SEM en distintos aumentos para cada grupo, ya que, cada grupo que se utilizó para obtener las micrografías fue sintetizado bajo cuatro distintas condiciones.

Es importante mencionar que la ingeniería de tejidos busca que los andamios sintetizados tengan una arquitectura similar, adecuada, a la del tejido a reparar, por lo tanto, es indispensable que el andamio sintetizado para la regeneración de tejido óseo tenga una arquitectura 3D porosa, con una adecuada porosidad e interconexión entre sus poros, la cual permita facilitar la infiltración celular, la migración, la vascularización, el oxígeno, el flujo de nutrientes y la eliminación de distintos materiales de desecho, además, la arquitectura también debe ser capaz de soportar cargas externas. Otra característica importante que se debe considerar para sintetizar un andamio 3D para la regeneración de tejido óseo es el tipo de material que se utilizará para la síntesis, ya que, dicho material debe ser no tóxico y capaz de no estimular una respuesta inflamatoria, es por esta razón que para sintetizar el andamio se optó por utilizar policaprolactona (PCL) como material, puesto que, es un polímero sintético, biodegradable, no tóxico, el cual ha sido utilizado en el diseño de andamios debido a su aprobación por la FDA, por lo tanto, un andamio 3D apropiado para la regeneración del tejido óseo debe contar con las propiedades superficiales físicas y químicas apropiadas, capaces de promover, la infiltración, unión, crecimiento, proliferación y migración celular adecuada, para poder regenerar tejido óseo de *novo* (18,58,87).

En la siguiente Figura 7. Se puede observar la micrografía obtenida del grupo 1, el cual, corresponde al andamio de PCL sintetizado por medio de la técnica de lixiviación de sal, bajo la condición de 2 hrs de secado a distintos aumentos, las micrografías obtenidas sirvieron para poder realizar el análisis de la superficie del andamio bajo las condiciones ya mencionadas, por lo tanto, en la Figura 7.A) se puede observar una superficie rugosa, la cual, no es completamente homogénea, ya que, hay zonas en la superficie del andamio que se observan lisas, además, se pueden observar poros de distintos tamaños los cuales no se observa una interconexión entre ellos, ya que, la interconectividad

entre los poros del andamio se pueden observar cómo huecos que unen un poro con otro poro, por consiguiente, como se menciona en la literatura la interconectividad de los poros es un factor de suma importancia que se debe tomar en cuenta para el diseño y la caracterización de andamios para la regeneración del tejido óseo, de modo que, se mimetice la arquitectura porosa la cual está altamente interconectada en la estructura ósea nativa (88,89).

En la siguiente Figura 7.B) se puede observar un aumento de ( 100X ) de la Figura 7.A) por lo que, en esta micrografía se puede observar con más detalle que existe una zona con mayor rugosidad en comparación con otras zonas de la superficie del andamio, las cuales pueden observarse lisas, además, se pueden observar poros de distintos tamaños los cuales no se observa que tengan una interconexión entre ellos. Por otro lado, en la Figura 7. C) se puede observar un aumento de ( 500X ) de la Figura 7.A), en esta micrografía se puede observar la zona de la superficie del andamio rugosa, en la cual se pueden observar poros los cuales no se observa que se encuentren interconectados entre ellos. Finalmente, en la micrografía con un aumento de ( 1000X ) en la Figura 7.D) se puede observar con más detalle los poros formados mediante la técnica de lixiviación de sal, los cuales no se encuentran interconectados entre ellos, además, en esta micrografía se observa una superficie lisa. Por otro lado, se obtuvo el tamaño mínimo y máximo de los poros, con un aumento de ( 100X ) obteniendo como tamaño máximo 424.4  $\mu\text{m}$  y un mínimo de 8.4  $\mu\text{m}$  de longitud.

En conclusión, la Figura 7. Nos muestra que, el andamio fabricado por medio de la técnica de lixiviación de sal bajo la condición de 2 h de secado, no cuenta con las características superficiales necesarias para considerarse como un andamio para la regeneración del tejido óseo, ya que, no se observa una superficie porosa con poros interconectados entre sí, lo cual beneficiaría a una correcta adhesión, proliferación y migración celular, además, como lo ha demostrado Metwally *et al.* en su estudio comparando la superficie de fibras de PCL lisas frente a las fibras de PCL porosas, las fibras de PCL porosas mostraron que las células que crecen en los andamios porosos formaron un mayor número de filopodios en comparación con los andamios lisos, ya que estos, prefieren una superficie rugosa para su fijación, además, en el andamio de fibras porosas de PCL se

observó que también se formaron lamelipodios los cuales se adhirieron a los poros del andamio, mostrando de esta forma una adhesión celular fuerte en la superficie rugosa del andamio, por lo tanto, es de gran importancia poder fabricar un andamio 3D con una superficie porosa e interconectada (90).

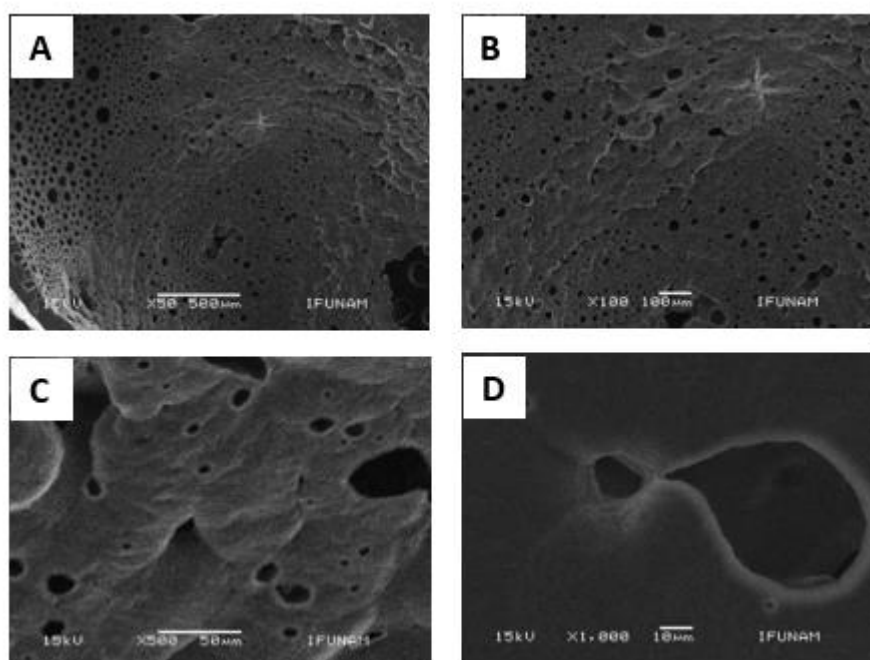


Figura 7. Micrografías de la superficie por SEM a distintos aumentos del andamio de PCL fabricados por medio de la técnica de lixiviación de sal bajo la condición de 2 hrs de secado. A) ( 50X ), B) ( 100X ), C) ( 500X ) y D) ( 1000X ).

En la Figura 8. Se puede observar las micrografías obtenidas del grupo 2, las cuales, corresponden al andamio de PCL sintetizado por medio de la técnica de lixiviación de sal bajo la condición de 24 h de secado a distintos aumentos, estas micrografías nos ayudaron a realizar el análisis de la superficie del andamio, por lo tanto, en la figura 8.A) se muestra la imagen con un aumento ( 50X ), donde podemos observar una superficie rugosa, la cual es homogénea, ya que, se puede observar en toda la micrografía, además, se pueden observar poros de distintos tamaños los cuales presentan una morfología de poros irregular, alrededor de toda la imagen. En la Figura 8.B) se muestra la imagen con un aumento ( 100 X ), en esta micrografía podemos observar una superficie rugosa, la cual se encuentra de forma homogénea en toda la superficie de la imagen,

también, podemos observar a lo largo de la imagen poros de distintos tamaños, además, se puede observar una interconexión entre los poros. Conforme se van realizando aumentos en la micrografía como en la Figura 8.C) la cual corresponde a un aumento ( 500X ) y la Figura 8. D) se puede observar que la superficie continúa siendo rugosa, con poros de distintos tamaños, los cuales se encuentran interconectados entre ellos. Además, se obtuvo el tamaño mínimo y máximo de los poros con un aumento de ( 100X ) por lo que el máximo del tamaño del poro fue de 203.7  $\mu\text{m}$  y un mínimo de 11.5  $\mu\text{m}$  de longitud.

En general, en todas las imágenes se observó una superficie rugosa, la cual, como se ha mencionado en la literatura es de gran importancia ya que tiene una influencia en la adsorción de proteínas, por lo tanto, los sitios de adsorción de proteínas son importantes para que de esta forma sean absorbidas más proteínas en los andamios, puesto que, estas proteínas van a participar estimulando ciertas funciones celulares osteogénicas, tales como, la unión, proliferación, diferenciación y biomineralización, así como lo mencionó Deng *et al.* en su estudio el cual encontró que la unión celular en una superficie rugosa era mejor que en una superficie no rugosa, debido a una mayor cantidad de sitios de unión para las proteínas, generando de esta forma una interacción andamio-célula (91,92). Otro de los beneficios de tener una superficie rugosa con microporosidades en el andamio es que se puede mejorar la permeabilidad de los andamios generando un mayor número de sitios de adsorción de proteínas y mejorando la degradación de los andamios, ya que, como se ha mencionado en la literatura, un andamio ideal necesita que la tasa de degradación del andamio sea la adecuada de acuerdo con la tasa de regeneración del tejido óseo de *novo*, por lo que, investigadores mencionan que las microporosidades en el andamio podría proporcionar un mayor número de sitios de nucleación para la precipitación biológica de la apatita similar a la del tejido óseo, esto se observó en andamios microporosos basados en fosfato de calcio (CaP), los cuales, al ser colocados en un entorno fisiológico, aceleran su degradación y la liberación de calcio y fosfato, generando un niveles de sobresaturación en el entorno circundante, provocando que la apatita biológica pueda precipitarse de una mejor forma dentro de los andamios, por otro lado, también existen estudios que han demostrado que los andamios microporosos que no estén basados en fosfato de

calcio (CaP), pero al ser colocados en un microambiente con iones de fluidos corporales podrían formar apatitas biológicas en su superficie, generando un efecto positivo sobre la biomineralización de los andamios porosos (91). Por lo tanto, la fabricación del andamio de PCL mediante la técnica de lixiviación de sal bajo las condiciones de secado de 24 hrs resultó efectiva para poder obtener una superficie porosa en el andamio, tal y como se observó en las micrografías.

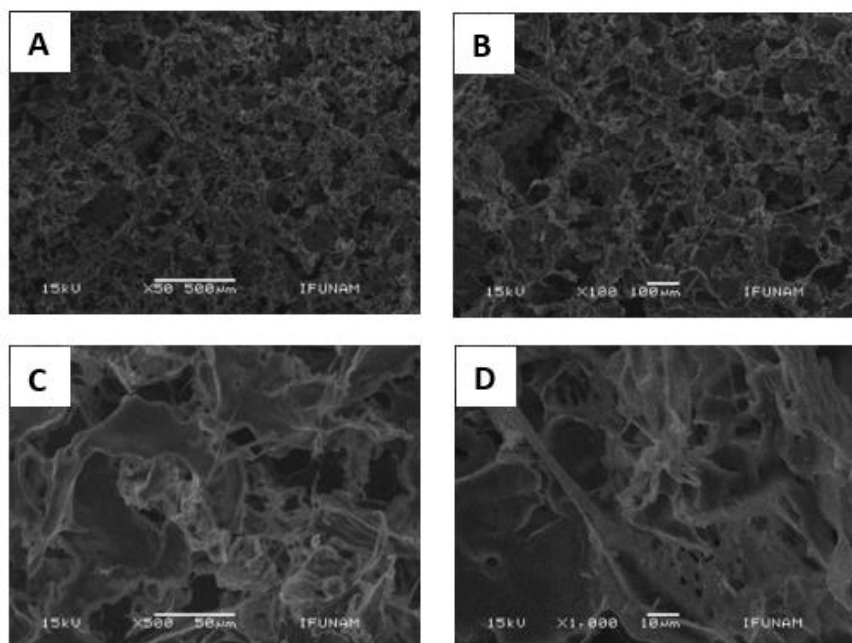


Figura 8. Micrografías de la superficie obtenidas por SEM a distintos aumentos del andamio de PCL fabricados por medio de la técnica de lixiviación de sal bajo la condición de 24 h de secado. A) ( 50X ), B) ( 100X ), C) ( 500X ) y D) ( 1000X ).

Continuando con los resultados de la síntesis de los andamios bajo distintas condiciones, en la siguiente Figura 9. Puede observarse las micrografías obtenidas del grupo 3, las cuales, corresponden al andamio de PCL sintetizado por medio de la técnica de lixiviación de sal bajo las condiciones de 24 h de congelamiento de 2 h de secado a distintos aumentos, estas micrografías nos ayudaron a realizar el análisis cualitativo de la superficie del andamio, por lo tanto, en la Figura 9.A) se muestra la imagen con un aumento ( 50X ), en la cual se puede observar una superficie con dos zonas principalmente: una lisa y otra rugosa, en la superficie lisa se pueden observar pocos poros en comparación



con la superficie rugosa la cual se observa que es más porosa y se pueden observar poros de distintos tamaños. Esta imagen no tiene una superficie homogénea, por lo que, no cuenta con las características de una superficie necesaria para un andamio para la regeneración del tejido óseo. En la siguiente Figura 9.B) se observa una imagen con un aumento ( 100X ) en la cual se observa con más detalle la zona rugosa con distintos tamaños de poro, los cuales no se observan interconectados entre ellos. Asimismo, como se puede observar en la Figura 9.C) con un aumento de ( 500X ) existe la presencia de poros de distintos tamaños, los cuales no se encuentran interconectados entre ellos, además, la zona rugosa que se observaba en la Figura 9.A) puede observarse con mayor detalle, evidenciando que esta zona no es completamente rugosa, ya que existen zonas entre los poros que se encuentran lisas, algo que puede observarse de mejor manera en la Figura 9.D) con un aumento de ( 1000X ) en la cual pueden observarse cada vez menos poros, los cuales no están interconectados. Por otro lado, se obtuvo el tamaño mínimo y máximo de los poros, con un aumento de ( 100X ) por lo que el máximo del tamaño del poro fue de 186.3  $\mu\text{m}$  y un mínimo de 14.2  $\mu\text{m}$ .

Como se ha mencionado anteriormente, la literatura menciona que la porosidad adecuada en un andamio es un criterio fundamental, el cual debe tomarse en cuenta a la hora de fabricar andamios para la regeneración del tejido óseo, ya que una adecuada porosidad en la superficie del andamio va a permitir que haya una mayor permeabilidad en el andamio, generando una adecuada adhesión celular, migración, proliferación y producción de matriz extracelular dentro del andamio, justo en el sitio del defecto óseo para que se lleve a cabo la regeneración del tejido óseo de *novus* en el defecto, por lo tanto, si las células del microambiente alrededor del defecto no migran, proliferan y secretan la matriz extracelular en el andamio, no se llevará a cabo la reparación tisular del defecto. Asimismo, como lo ha mencionado Krebs *et al.* en su estudio, en el cual se compararon andamios de PLGA porosos con los andamios de PLGA no porosos, los andamios de PLGA no porosos en los cuales se sembraron células, no mostraron una proliferación celular, mientras que, en los andamios de PLGA porosos si observó un mayor número de células, además, conforme pasaban los días hubo un aumento en el número de células en los andamios porosos la cual

fue estadísticamente mayor que en los andamios no porosos en el mismo punto de tiempo. Por lo tanto, es importante tomar en cuenta el tipo de superficie que se genera en el andamio a partir de su fabricación, ya que, de esto dependerá su funcionalidad para la ingeniería de tejido óseo (93).

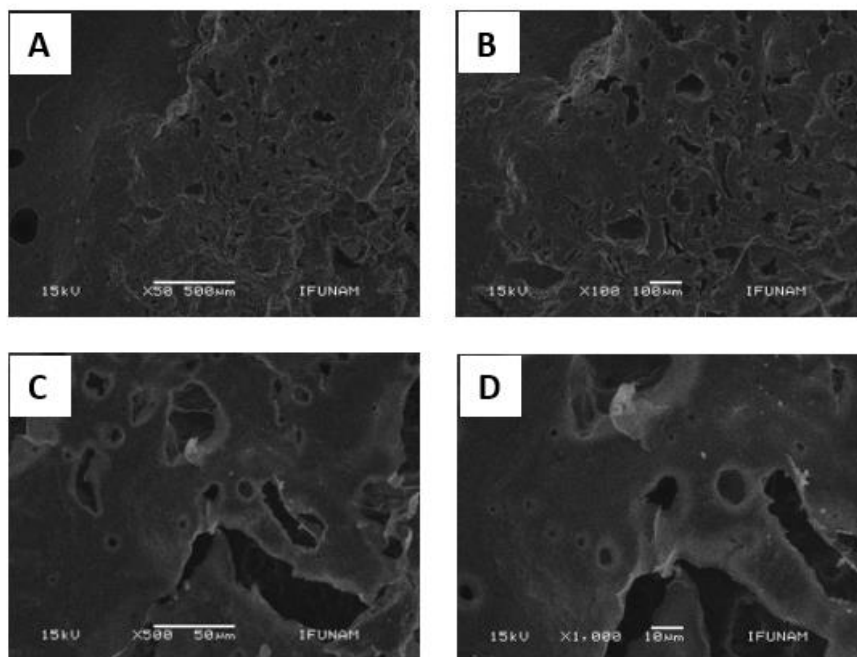


Figura 9. Micrografías de la superficie por SEM a distintos aumentos del andamio de PCL fabricados por medio de la técnica de lixiviación de sal bajo las condiciones de 24 hrs de congelamiento y 2 hrs secado. A) ( 50X ), B) ( 100X ), C) ( 500X ) y D) ( 1000X ).

Por otro lado, las imágenes de SEM que faltan por analizar son las de la Figura. 10 en donde se pueden observar las micrografías obtenidas a distintos aumentos del grupo 4, las cuales, corresponden al andamio de PCL sintetizado por medio de la técnica de lixiviación de sal bajo las condiciones de 24 h de congelamiento, 2 h secado y 5 ciclos de congelar 1 h y descongelar 30 min, estas micrografías nos ayudaron a realizar el análisis cualitativo de la superficie del andamio, por lo tanto, en la Figura 10.A) se muestra la imagen con un aumento ( 50X ) en la cual se observa una superficie lisa, con poros de distintos tamaños, los cuales no se observa que se encuentren interconectados entre ellos, además, en la Figura 10. B) la cual tiene un aumento mayor de ( 100X ) se puede observar con mejor detalle que esa zona de la superficie del andamio se encuentra lisa,

con poros de distintos tamaños los cuales únicamente se encuentran en una parte de la superficie del andamio y no de forma homogénea en toda la superficie del andamio. Por otro lado, en la Figura 10. C) la cual tiene un aumento de ( 500X ) se puede observar de mejor manera los poros, los cuales se observan que están interconectados con otros poros que se encuentran dentro de ellos, sin embargo, estos poros están en una superficie lisa, por lo que no se puede observar una superficie rugosa la cual pueda mimetizar la arquitectura del tejido óseo, asimismo, en la Figura 10. D) con un aumento de ( 1000X ) se pueden observar con mayor detalle los poros que se encuentran dentro de los poros los cuales son de distintos tamaños, además, los poros de mayor tamaño se comunican con los poros de menor tamaño, sin embargo, en la Figura 10. A) podemos observar que la superficie es lisa por lo que estas interconexiones entre los poros no son las adecuadas ya que se necesita tener una superficie más rugosa para poder mimetizar la arquitectura del tejido óseo. También, se obtuvo el tamaño mínimo y máximo de los poros, con un aumento de ( 100 X ) por lo que se obtuvo un tamaño máximo del poro de 259.2  $\mu\text{m}$  y un mínimo de 13.9  $\mu\text{m}$ .

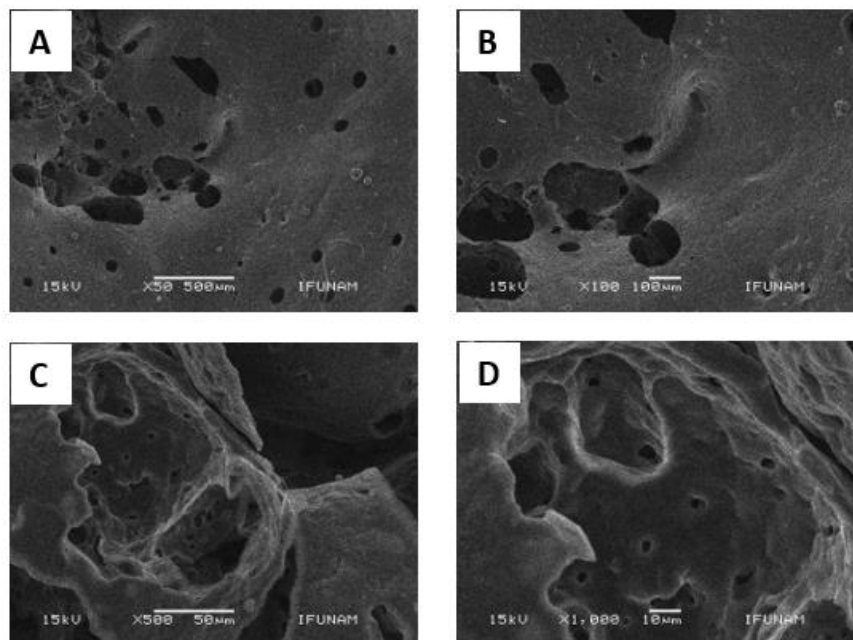


Figura 10. Micrografías de la superficie por SEM a distintos aumentos del andamio de PCL fabricados por medio de la técnica de lixiviación de sal bajo las condiciones de 24 h de congelamiento, 2 h secado y 5 ciclos de congelar 1 h y descongelar 30 min. A) ( 50X ), B) ( 100X ), C) ( 500X ) y D) ( 1000X ).

Posteriormente, se decidió comparar cuatro imágenes de SEM, las cuales, corresponden a cada una de los grupos con las distintas condiciones descritas anteriormente para la fabricación de los andamios de PCL. Es importante señalar, que uno de los objetivos principales de un andamio es mimetizar la matriz extracelular del tejido a reparar, en este caso del tejido óseo, por esta razón, en la Figura 11., se compara la microarquitectura de la región trabecular de la tibia con las imágenes obtenidas a través de SEM a partir de la síntesis de PCL bajo distintas condiciones, por lo tanto, en la Figura 11. A) Se puede observar la micrografía del andamio de PCL sintetizado por medio de la técnica de lixiviación de sal bajo la condición de 2 h de secado, por lo tanto, se puede ver una superficie rugosa con poros los cuales no están interconectados entre sí, ya que, la interconectividad entre los poros del andamio se pueden observar cómo huecos que unen un poro con otro poro, por consiguiente, como se menciona en la literatura la interconectividad de los poros es un factor de suma importancia que se debe tomar en cuenta para el diseño y la caracterización de andamios para la regeneración del tejido óseo, de modo que, se mimetice la arquitectura porosa la cual está altamente interconectada de la estructura ósea nativa (88,89). Por otra parte, en la Figura 11.B) la cual corresponde a la micrografía del andamio de PCL bajo la condición de 24 h de secado, se puede observar una superficie rugosa, con poros abiertos, los cuales se encuentran interconectados, esta micrografía muestra una arquitectura porosa similar a la micrografía de la Figura 11. E) en la cual se puede observar la arquitectura de la región trabecular de la tibia, esta similitud entre la arquitectura de ambas micrografías nos muestra que el andamio de PCL bajo la condición de 24 h de secado ha tratado de mimetizar la arquitectura trabecular del hueso, la cual es de gran importancia para promover un correcto crecimiento y diferenciación celular, así como, vascularización que promuevan la osteogénesis (88). Además, en la Figura 11. C) se puede observar la micrografía del andamio de PCL sintetizado bajo la condición de 24 h de congelamiento y 2 h de secado, por lo que, en esta micrografía podemos ver una superficie lisa con poros los cuales no presentan interconexión entre ellos, por lo tanto, como se ha mencionado anteriormente, es necesario obtener un andamio poroso interconectado que permita la distribución y difusión uniforme de las células en toda la estructura del andamio 3D (94). Asimismo, en la Figura 11. D) se puede observar el andamio

de PCL fabricado por medio de la técnica de lixiviación de sal bajo las condiciones de 24 h de congelamiento, 2 h secado y 5 ciclos de congelar 1 h y descongelar 30 min, por lo que, se pueden observar poros en la superficie del andamio los cuales se observa que se encuentran interconectados con otros poros más pequeños, sin embargo, este andamio cuenta con una superficie lisa, la cual, no cumple con las características superficiales necesarias para un andamio para la regeneración de tejido óseo.

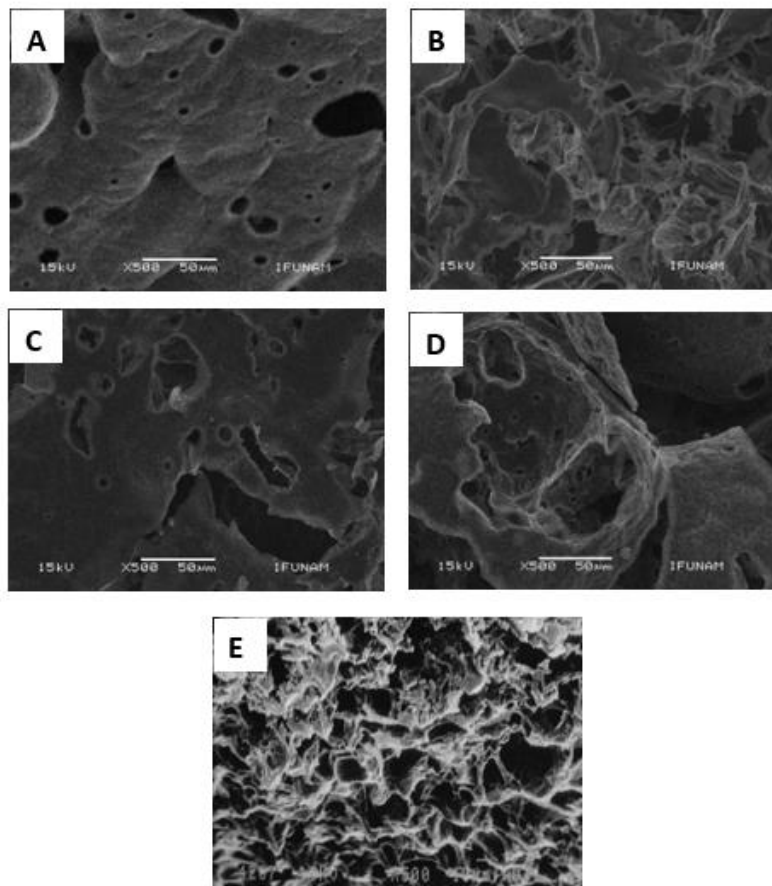


Figura 11. Micrografías de la superficie obtenidas por SEM ( 500X ) de los andamios de PCL fabricados por medio de la técnica de lixiviación de sal a través de distintas condiciones de secado y congelamiento y su comparación con la SEM ( 500X ) de la región trabecular de la tibia. A) 2 h de secado, B) 24 h de secado, C) 2 h de secado y 24 hrs de congelamiento, D) 2 hrs de secado, 24 hrs de congelamiento y 5 ciclos de congelar 1 h y descongelar 30 min, E) Micrografía de la región trabecular de la tibia, imagen tomada de Bhardwaj (101).

Después de haber obtenido los resultados cualitativos de cada uno de los grupos, los cuales, representan a cada una de las condiciones, se optó por escoger al grupo que representará al andamio con las mejores características superficiales, las cuales trataran de imitar a la arquitectura del tejido óseo. De esta forma, se determinó que el grupo 2, el cual, corresponde al andamio bajo las condiciones de 24 h de secado, fueron las mejores condiciones para obtener una superficie rugosa, la cual además de imitar al tejido óseo, cuenta con otras características que permitirían una adecuada adhesión, migración y proliferación celular para poder regenerar el tejido óseo en un defecto específico, por lo que, se optó por volver a realizar la síntesis de los andamios de PCL por medio de la técnica de lixiviación de sal, bajo esta condición únicamente. Por lo tanto, se obtuvieron 23 andamios de PCL como se observa en la Figura 12., de los cuales, únicamente se tomaron 6 andamios aleatoriamente para poder adquirir las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) correspondientes, es importante mencionar que únicamente se utilizaron 3 andamios diferentes de los 6 para obtener las imágenes de SEM, por lo que, posteriormente se tomaron las imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM) en el Instituto de Física de la UNAM.

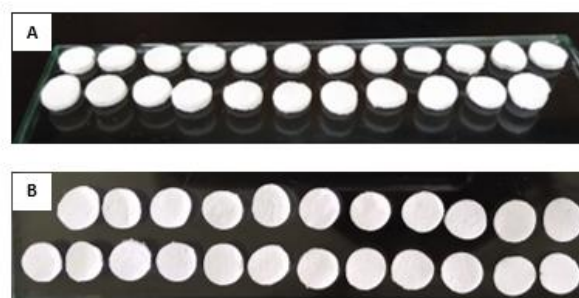


Figura 12. Resultado de la síntesis de los andamios de PCL mediante la técnica de lixiviación de sal. A,B) Andamios de PCL de 9 mm de diámetro x 2 mm de espesor.

Posterior a la obtención de las imágenes de SEM, se realizó el análisis de las micrografías, donde se analizó la superficie del grupo 2, el cual, corresponde a los andamios de PCL bajo la condición de 24 h de secado en distintos aumentos, por lo que, en la Figura 13. Se pueden observar las micrografías de la superficie por SEM a distintos aumentos de los andamios de PCL fabricados por medio de la técnica de lixiviación de sal a través de la condición que corresponde a 24 h

de secado. En la Figura 13. A, B,C) se pueden observar las micrografías de los andamios de PCL con un aumento ( 50X ), los cuales muestran una superficie completamente rugosa y homogénea, además, se pueden observar poros de distintos tamaños, los cuales juegan un papel muy importante, ya que la superficie del andamio debe ser rugosa para que se pueda tener una correcta permeabilidad que logre la adhesión de las células circundantes. Por otro lado, en la Figura 13. A1, B1, C1) se observan las micrografías iniciales pero a un aumento de ( 100X ), donde se puede observar una superficie rugosa, con poros de distintos tamaños, esta superficie rugosa y porosa se puede observar en toda la micrografía de forma homogénea, además, es parecida a la arquitectura del tejido óseo. Finalmente, en la Figura 13. A2,B2,C2) se pueden observar las micrografías de los andamios de PCL a un aumento de ( 300X ) donde se puede observar que la superficie continúa siendo rugosa de forma homogénea, con poros de distintos tamaños, los cuales, algunos de ellos se encuentran interconectados con la parte interna del andamio. Estas imágenes demuestran que el andamio de PCL sintetizado bajo las condiciones de 24 h de secado tiene una superficie rugosa, la cual se encuentra de forma homogénea en la superficie, además, se encuentra mimetizando la arquitectura del tejido óseo, por lo que, ésta condición se considera la mejor para la fabricación de andamios de PCL mediante la técnica de lixiviación de sal. Además, se obtuvo el tamaño mínimo y máximo de los poros, por lo que, en las micrografías con un aumento de ( 50X ) se obtuvo para la Figura 13. A) que el máximo del tamaño del poro fue de 443.1  $\mu\text{m}$  y un mínimo de 37.4, mientras que, para la Figura 13. B) el máximo fue de 375.6  $\mu\text{m}$  y un mínimo de 31.2  $\mu\text{m}$ , finalmente en la Figura 13. C) el máximo fue de 396.1  $\mu\text{m}$  y un mínimo 53.2  $\mu\text{m}$ .

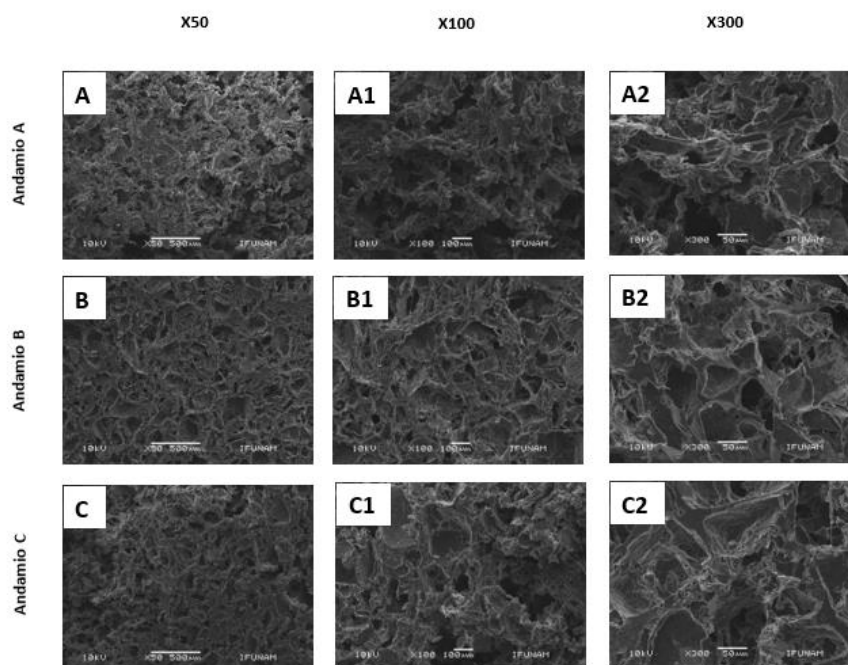


Figura 13. Micrografías de la superficie por SEM a distintos aumentos de los andamios de PCL fabricados por medio de la técnica de lixiviación de sal a través de la condición número 2, la cual corresponde a 24 h de secado . A) ( 50X ), A1) ( 100X ), A2) ( 300X ). B) ( 50X ), B1) ( 100X ), B2) ( 300X ), C) ( 50X ), C1) ( 100X ), C2) ( 300X ).

## B) Tamaño de poro

Se obtuvieron imágenes de SEM de las muestras de PCL del grupo 2 bajo las condiciones de 24 h de secado, las cuales, mostraron tener las mejores características superficiales y posteriormente fueron sintetizadas para poder confirmar que contaban con las mejores características superficiales, así como, un adecuado tamaño de los poros.

Mediante el software Image J<sup>®</sup> se midió el diámetro de los poros de las muestras experimentales del grupo 2, bajo la condición de 24 h de secado.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

- Como se puede observar en la Figura 14. La mayoría de los andamios de PCL porosos sintetizados bajo las condiciones del grupo 2, mostraban una longitud de poros entre 100-150  $\mu\text{m}$ , mientras que, en menor cantidad se puede observar poros con una longitud de 350-450  $\mu\text{m}$ , lo cual corresponde con el tamaño del porógeno utilizado para la fabricación de



los andamios, además, Murphy y col. informaron que un tamaño de poro de 100 a 325  $\mu\text{m}$  es óptimo para andamios fabricados para la regeneración del tejido óseo.

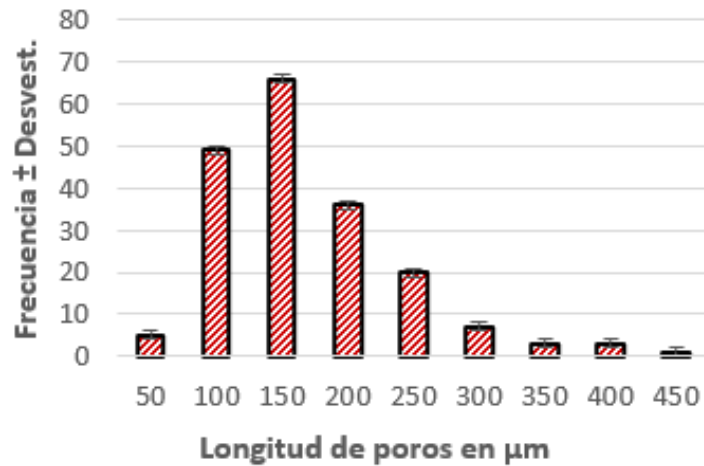


Figura 14. Representa tamaño promedio de los poros de los 3 andamios sintetizados bajo las condiciones de 24 h de secado, los cuales corresponden al grupo 2.

## IX.- Discusión

La ingeniería de tejido (IT) es un campo novedoso, interdisciplinario, cuyo objetivo principal es restablecer y mejorar la función de los tejidos afectados por medio de la fabricación de andamios tridimensionales (3D), sembrarlos con células y con factores de crecimiento, estas tres estrategias metodológicas utilizadas en la IT se conocen como la triada de la ingeniería de tejidos (18). Estos tres componentes principales se pueden definir como: 1) Un andamio el cual proporciona estructura y sustrato para el crecimiento y desarrollo del tejido. 2) Una fuente de células para facilitar la formación de tejido. 3) Factores de crecimiento para dirigir el crecimiento y la diferenciación de las células dentro del andamio (62). Sin embargo, a medida que progresa el campo de la IT existe una necesidad de crear andamios con biomateriales de primer nivel, reproducibles y de fácil acceso, los cuales se han convertido en un desafío primordial. Por lo que, en la actualidad, existe el uso de diversos polímeros sintéticos en el área biomédica debido a sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas como, por ejemplo, la resistencia a la tracción, el módulo elástico y la tasa de degradación, las cuales son comparables a las del tejido óseo. Otro de los grandes beneficios

que ofrecen los polímeros sintéticos es que son más económicos que los polímeros naturales, ya que pueden ser producidos en grandes cantidades de manera uniforme, presentando un largo periodo de conservación, además, están disponibles de manera comercial ya que tienen propiedades fisicoquímicas y mecánicas comparables a la de distintos tejidos (74). Dentro de los materiales sintéticos que más han atraído la atención para su uso en ingeniería de tejidos y para aplicaciones biomédicas, se encuentra el PCL (policaprolactona), el cual, es un polímero sintético, semicristalino, biodegradable, no tóxico, que se utiliza para el diseño de andamios 3D debido a su aprobación por la FDA y por su excelente resistencia mecánica, por lo tanto, ha sido utilizado en procesos regenerativos de hueso y de cartílago, además, también ha sido utilizado para la fabricación de aditamentos médicos, tales como, las suturas quirúrgicas y en sistemas de administración de fármacos. Entre las características de PCL se encuentran que es estable, económico, fácil de conseguir y de alta calidad para la síntesis de andamios 3D (18,58).

Una de las características principales que deben tener los andamios para la regeneración del tejido óseo es que deben de ser capaces de mimetizar la matriz extracelular del tejido óseo, la cual proporcionará una estructura adecuada y el microambiente correcto para la regeneración del tejido en la zona del defecto. Además, los andamios deben de contar con ciertas características, tales como, una excelente biocompatibilidad, una adecuada tasa de degradación y una respuesta no inmunogénica, también, deben de tener propiedades de osteoconducción (95,96).

La matriz extracelular del tejido óseo puede asimilarse como un andamio 3D nanocompuesto, ya sea de manera orgánica e inorgánica, dentro de los componentes orgánicos predomina el colágeno de tipo I, mientras que la hidroxiapatita predomina dentro de los componentes inorgánicos, por lo tanto, los cristales de hidroxiapatita se encuentran introducidos entre los espacios que se forman entre las moléculas de colágeno, aumentando de esta forma la rigidez del tejido óseo. Además, el tejido óseo es considerado un tejido jerárquico, especializado, con estructuras de poros, con una organización celular y composición de materiales los cuales dirigen su función, por lo tanto, la microporosidad del tejido óseo, permite que se lleve a cabo la migración celular

y la vascularización, mientras que las características de escala micrométrica y nanométrica facilitan la adhesión celular, la diferenciación y la nucleación mineral (96). Por lo tanto, es importante tomar en cuenta las características físicas del andamio 3D, tales como, la porosidad, interconectividad, geometría de los poros, tamaño de los poros, así como, la topografía de la superficie, ya que, estas características van a mimetizar la matriz extracelular del tejido óseo, así como, brindar una transmisión de sustancias nutritivas, además de una correcta adhesión celular, la cual, representa un mecanismo importante en la regeneración tisular, por consiguiente, la técnica de fabricación así como el polímero utilizado durante la síntesis del andamio 3D juega un papel muy importante. Por otra parte, la técnica de lixiviación de partículas y fundición de disolventes utilizada para fabricar andamios porosos 3D, es en la actualidad una técnica popular para la fabricación andamios poliméricos porosos 3D, ya que, este método de fabricación es relativamente simple y directo, el cual, no necesita de equipos específicos, sofisticados y costosos, comparado con otras técnicas de fabricación modernas, tales como, impresión 3D, electrohilado, sinterización selectiva por láser (SLS) y la extrusión por fusión o el modelado por deposición fundida (FDM), las cuales, necesitan equipo especializado para la fabricación de andamios 3D, asimismo, el método de lixiviación de partículas y fundición de disolventes permite controlar la porosidad, el tamaño de los poros y la interconectividad mediante una adecuada selección del polímero, del porógeno y de sus cantidades relativas (97).

Por otro lado, en la literatura se menciona que existen distintos materiales utilizados como agentes porógenos, los cuales al ser utilizados para la fabricación de andamios 3D, muestran una adecuada microestructura de poros, haciéndolos adecuados para diversas aplicaciones innovadoras en el tejido óseo. Además, los agentes porógenos son capaces de formar microestructuras muy ordenadas con poros orientados, permitiendo, la adhesión, migración y proliferación celular. Sin embargo, es importante mencionar que el tipo de agente porógeno, la cantidad utilizada para la fabricación de andamios, la morfología y la distribución del tamaño de la partícula pueden contribuir en la porosidad, tamaño de poro e interconectividad (83).

Ruiz *et al.* mencionan en su artículo que los andamios 3D de fosfato tricálcico que no se fracturaron y que mostraron una estructura porosa en el andamio, serían los más adecuados para aplicaciones de tejido óseo, ya que, facilitarían la adhesión, proliferación y diferenciación celular, permitiendo la osteointegración (83).

Por otra parte, una de las características importantes implicada en la diferenciación celular es la rugosidad de la superficie, por este motivo, Faia-Torre *et al.* en su estudio mostró que al cultivar células estromales mesenquimales humanas (hMSC) en sustratos de PCL con un gradiente de rugosidad superficial, encontró, que estas células estromales cultivadas en sustratos con una rugosidad superficial de 2,1 a 3,1  $\mu\text{m}$  mostraron una mayor capacidad de diferenciación osteogénica. Estos resultados muestran que al ajustar la rugosidad de la superficie es posible optimizar la superficie de los sustratos. Además como menciona Cheng *et al.* los cambios que se presentan en la rugosidad de la superficie a microescala también pueden influir en la unión y proliferación celular durante la implantación inicial, seguida de una diferenciación osteoblástica a largo plazo (98).

Krebs *et al.* reportó que al sembrar células en andamios con superficies diferentes, encontró que en los andamios de PGLA porosos tenían células en todo el andamio, mientras que, en los andamios de PLGA no porosos mostraban células únicamente en la superficie periférica exterior. Estos resultados corroboran que sin porosidad superficial en los andamios, las células no tienen la capacidad de infiltrarse en la mayor parte del constructo 3D. En los andamios no porosos, las células no aumentaron en un periodo de 15 días, mientras que en los andamios porosos las células si proliferaron, estos resultados sugieren que los andamios porosos presentan mejores características superficiales para la proliferación celular en comparación con los andamios no porosos (93). Y con un gradiente de porosidad pueden ser un buen candidato para la regeneración ósea (87).

De modo que, en este estudio a través de la técnica de lixiviación de partículas y fundición de disolventes utilizando cloruro de sodio como agente porógeno, se pudieron obtener andamios con características superficiales adecuadas, tales como, rugosidad en la superficie del andamio y un adecuado tamaño poro, ya

que, en diferentes micrografías con distintos aumentos se pudo mostrar que en toda la superficie del andamio se obtuvo una rugosidad homogénea con un tamaño de poro heterogéneo, estas características se obtuvieron de los andamios del grupo 2 los cuales se fabricaron a través de la condición de 24 h de secado, asimismo, las micrografías de la Figura 13. demuestran que los andamios del grupo 2 tienen una superficie ordenada y además cuentan con una técnica reproducible.

Adicionalmente, se pudieron obtener las características superficiales de los otros grupos, los cuales, tenían distintas condiciones de secado y de congelamiento, por lo tanto, los andamios del grupo 1, 3 y 4 no mostraron a través de las imágenes de SEM características superficiales adecuadas para un andamio 3D para la regeneración del tejido óseo.

Con respecto al tamaño de poros, los tres andamios sintetizados bajo las condiciones del grupo 2, mostraron una mayor cantidad de poros con una longitud de entre los 100-150  $\mu\text{m}$ , por lo que, en general, se necesita un tamaño de poro superior a los 100  $\mu\text{m}$  para la formación de tejido óseo vascularizado, para garantizar la vascularización, migración celular, difusión de nutrientes y la eliminación de desechos metabólicos (99). Se encontraron poros con un rango entre los 50-450  $\mu\text{m}$  y en menor cantidad con un rango de 350-450  $\mu\text{m}$ . Los tamaños de los poros encontrados en estos andamios se relacionan con el tamaño del porógeno utilizado de 250-425  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, la longitud de los poros menores a 100  $\mu\text{m}$  se asocia a la liberación de gases durante la descomposición del porógeno residual de los andamios (83). Murphy y col. reportaron que un tamaño de poro entre 100-325  $\mu\text{m}$  es excelente para andamios de ingeniería de tejido óseo, por lo tanto, los andamios fabricados mediante las condiciones del grupo 2, mostraron obtener un tamaño de poro adecuado para la fabricación de andamios 3D para la regeneración del tejido óseo (87).

Otro punto importante, es que, se necesita una macroporosidad, definida como un tamaño de poro  $>100 \mu\text{m}$  para facilitar la osteogénesis y la angiogénesis. También se necesita para promover la circulación de fluidos corporales y la migración celular, sin embargo, microporos  $<20 \mu\text{m}$  son capaces de mejorar la capilaridad de los andamios para la regeneración de tejido óseo, además, existe un aumento de las áreas de superficie específicas, las cuales, presentan más

sitios de adsorción de proteínas y aceleran la liberación de productos de degradación, facilitando las interacciones entre las células y los andamios. También, la fuerza capilar que se genera a través de la microporosidad puede mejorar la unión de las células relacionadas con el tejido óseo en la superficie de los andamios, incluso, puede hacer que las células logren penetrar en los microporos más pequeños que ellas (87,91). Finalmente, los diferentes tipos de células tienen tamaños y formas distintos, por lo tanto, el tamaño óptimo puede diferir entre los diferentes tipos de células, por ejemplo, el tamaño de los osteoblastos es de 10 a 50  $\mu\text{m}$ , sin embargo, los osteoblastos prefieren poros con un tamaño de 100-200  $\mu\text{m}$  para poder regenerar el tejido óseo mineralizado después de la implantación (87).

## **X.- Conclusiones**

A partir de los grupos que se generaron en este trabajo bajo distintas condiciones de fabricación por medio de la técnica de lixiviación de partículas y fundición de disolventes con PCL, se obtuvo un andamio poroso con las características superficiales similares a las de la matriz extracelular del tejido óseo, de un tamaño de poro adecuado, que es un buen candidato para poder continuar estudiando el proceso de regeneración ósea en defectos de tamaño crítico.

## Referencias

1. Burr DB. Bone Morphology and Organization. In: Basic and Applied Bone Biology. 2019.
2. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. BioMed Research International. 2015.
3. Tobeiha M, Moghadasian MH, Amin N, Jafarnejad S. RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. BioMed Research International. 2020.
4. Metzger CE, Anand Narayanan S. The role of osteocytes in inflammatory bone loss. Frontiers in Endocrinology. 2019.
5. Lin X, Patil S, Gao YG, Qian A. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. Frontiers in Pharmacology. 2020.
6. Mansour A, Mezour MA, Badran Z, Tamimi F. Extracellular matrices for bone regeneration: A literature review. Tissue Engineering - Part A. 2017.
7. Subhash Mahajan. Encyclopedia of Materials: Science and Technology - 1st Edition. Pergamon. 2001.
8. Dey P. Bone Mineralisation. In: Contemporary Topics about Phosphorus in Biology and Materials. 2020.
9. Ross AC, Taylor CL, Yatkine AL DVH. Institute of Medicine Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. 2011;
10. Posa F, di Benedetto A, Colaianni G, Cavalcanti-Adam EA, Brunetti G, Porro C, et al. Vitamin D effects on osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from dental tissues. Stem Cells International. 2016;
11. Setiawati R, Rahardjo P. Bone Development and Growth. In: Osteogenesis and Bone Regeneration. 2019.
12. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN. 2008.
13. Junqueira LCU. Histologia básica texto & atlas. In: Guanabara Koogan. 2017.
14. Gartner L, Hiatt J. Texto Atlas de Histología. Journal of Chemical Information and Modeling. 2002;
15. Gartner LP. Texto de histología Atlas a color. In: Texto de histología Atlas a color. 2017.
16. Andrade FG de, Ferrari O. Atlas digital de Histologia básica. European Union. 2014.

17. Gilbert SF. Developmental Biology. Osteogenesis: The Development of Bones. Development Biology: 6th edition. 2000;
18. Chocholata P, Kulda V, Babuska V. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. Materials. 2019;12(4):568.
19. Seppänen-Kaijansinkko R. Tissue Engineering in Oral and Maxillofacial Surgery. Tissue Engineering in Oral and Maxillofacial Surgery. 2019.
20. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. International Journal of Oral Science. 2019.
21. Siaili M, Chatzopoulou D, Gillam DG. An overview of periodontal regenerative procedures for the general dental practitioner. Saudi Dental Journal. 2018.
22. Kao RT, Nares S, Reynolds MA. Periodontal Regeneration – Intrabony Defects: A Systematic Review From the AAP Regeneration Workshop. Journal of Periodontology. 2015;
23. Shukla S, Chug A, Mahesh L, Singh S, Singh K. Optimal management of intrabony defects: Current insights. Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry. 2019.
24. Needleman I, Worthington H v., Giedrys-Leeper E, Tucker R. WITHDRAWN: Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. The Cochrane database of systematic reviews. 2019.
25. Pilipchuk SP, Plonka AB, Monje A, Taut AD, Lanis A, Kang B, et al. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. Dental Materials. 2015;
26. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. International Journal of Polymer Science. 2011.
27. Ghiasi MS, Chen JE, Rodriguez EK, Vaziri A, Nazarian A. Computational modeling of human bone fracture healing affected by different conditions of initial healing stage. BMC Musculoskeletal Disorders. 2019;
28. Li J, Stocum DL. Fracture Healing. In: Basic and Applied Bone Biology. 2013.
29. Aragón Olaguibel A, García López M. PRINCIPIOS BIOLÓGICOS Y MECÁNICOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS FRACTURA. In: Manual del Residente de COT-SECOT. 2014.
30. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. Bioactive Materials. 2017.
31. Sheen JR, Garla V V. Fracture Healing Overview. StatPearls. 2019.



32. Dang M, Saunders L, Niu X, Fan Y, Ma PX. Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering. *Bone Research*. 2018 Dec 29;6(1).
33. Wang Y, Cai X, Huang J, Zhou Y, Jiang T, Wang Y. Bone regeneration in critically sized rat mandible defects through the endochondral pathway using hydroxyapatite-coated 3D-printed Ti<sub>6</sub>Al<sub>4</sub>V scaffolds. *RSC Advances*. 2018;8(55).
34. Rosales Ibáñez R, Alvarado Estrada KN, Ojeda Gutiérrez F. Ingeniería Tisular en Odontología. *Revista Adm*. 2012;VOL. LXIX(4):164–7.
35. Liang Y, Luan X, Liu X. Recent advances in periodontal regeneration: A biomaterial perspective. *Bioactive Materials*. 2020 Jun;5(2).
36. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2014 Oct 28;25(10).
37. Sohn H-S, Oh J-K. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomaterials Research*. 2019 Dec 14;23(1).
38. Zhao R, Yang R, Cooper PR, Khurshid Z, Shavandi A, Ratnayake J. Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments. *Molecules*. 2021 May 18;26(10).
39. Zhao R, Yang R, Cooper PR, Khurshid Z, Shavandi A, Ratnayake J. Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments. *Molecules*. 2021 May 18;26(10).
40. Sallent I, Capella-Monsonís H, Procter P, Bozo IY, Deev R v., Zubov D, et al. The Few Who Made It: Commercially and Clinically Successful Innovative Bone Grafts. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020 Sep 1;8.
41. Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Gryn timer M, Ganss B, Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomaterials Research*. 2017 Dec 5;21(1).
42. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *Journal of Clinical Periodontology*. 2019 Jun;46.
43. Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Gryn timer M, Ganss B, Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomaterials Research*. 2017 Dec 5;21(1).
44. Mahsut Dinçel Y. Bone Graft Types. In: *Bone Grafting - Recent Advances with Special References to Cranio-Maxillofacial Surgery*. IntechOpen; 2018.

45. Gómez Barrena Enriquez. Traumatología y ortopedia. Generalidades. 1st ed. Ampuero Cordero José, editor. Barcelona: Elsevier; 2020.
46. Mahsut Dinçel Y. Bone Graft Types. In: Bone Grafting - Recent Advances with Special References to Cranio-Maxillofacial Surgery. IntechOpen; 2018.
47. Shibuya N, Jupiter DC. Bone Graft Substitute. Clinics in Podiatric Medicine and Surgery. 2015 Jan;32(1).
48. Bracey DN, Cignetti NE, Jinnah AH, Stone A v., Gyr BM, Whitlock PW, et al. Bone xenotransplantation: A review of the history, orthopedic clinical literature, and a single-center case series. Xenotransplantation. 2020 Sep 5;27(5).
49. Fukuba S, Okada M, Nohara K, Iwata T. Alloplastic Bone Substitutes for Periodontal and Bone Regeneration in Dentistry: Current Status and Prospects. Materials. 2021 Feb 26;14(5).
50. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. Bone Research. 2013 Sep 25;1(3).
51. Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. The Bone & Joint Journal. 2016 Jan;98-B(1\_Supple\_A).
52. Ranjan Dahiya U, Mishra S, Bano S. Application of Bone Substitutes and Its Future Prospective in Regenerative Medicine. In: Biomaterial-supported Tissue Reconstruction or Regeneration. IntechOpen; 2019.
53. Safari B, Davaran S, Aghanejad A. Osteogenic potential of the growth factors and bioactive molecules in bone regeneration. International Journal of Biological Macromolecules. 2021 Apr;175.
54. Rodriguez IA, Growney Kalaf EA, Bowlin GL, Sell SA. Platelet-Rich Plasma in Bone Regeneration: Engineering the Delivery for Improved Clinical Efficacy. BioMed Research International. 2014;2014.
55. Zhao R, Yang R, Cooper PR, Khurshid Z, Shavandi A, Ratnayake J. Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments. Molecules. 2021 May 18;26(10).
56. Iaquinta MR, Mazzoni E, Bononi I, Rotondo JC, Mazziotta C, Montesi M, et al. Adult Stem Cells for Bone Regeneration and Repair. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2019 Nov 12;7.
57. Koyyada A, Orsu P. Recent Advancements and Associated Challenges of Scaffold Fabrication Techniques in Tissue Engineering Applications. Regenerative Engineering and Translational Medicine. 2021 Jun 23;7(2).
58. Chung S, King MW. Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds. Biotechnology and Applied Biochemistry. 2011;58(6):423–38.

59. Eltom A, Zhong G, Muhammad A. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*. 2019.
60. Amin AMM, Ewais EMM. Bioceramic Scaffolds. In: *Scaffolds in Tissue Engineering - Materials, Technologies and Clinical Applications*. InTech; 2017.
61. Han F, Wang J, Ding L, Hu Y, Li W, Yuan Z, et al. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020 Mar 24;8.
62. Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. Attribution-Non-Commercial-ShareAlike 1.0. Materials CM Murphy et al Cell-scaffold interactions European Cells and Materials [Internet]. 2013;26(26):120–32. Available from: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/1.0/> <http://creativecommons.org/worldwide/uk/translated-license/> <http://epubs.rcsi.ie/anatart/61/> [www.ecmjournal.org](http://www.ecmjournal.org)
63. Perez JR, Kouroupis D, Li DJ, Best TM, Kaplan L, Correa D. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2018 Jul 31;6.
64. Chandra PK, Soker S, Atala A. Tissue engineering: current status and future perspectives. In: *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier; 2020.
65. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*. 2008 Dec 13;17(S4).
66. Ghassemi T, Shahroodi A, Ebrahimzadeh MH, Mousavian A, Movaffagh J, Moradi PhD A. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *The Archives of Bone and Joint Surgery* [Internet]. 2018;6(2):90–9. Available from: [https://abjs.mums.ac.ir/article\\_10271.html](https://abjs.mums.ac.ir/article_10271.html)
67. Wei S, Ma J-X, Xu L, Gu X-S, Ma X-L. Biodegradable materials for bone defect repair. *Military Medical Research*. 2020 Dec 10;7(1).
68. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*. 2012 Oct;30(10).
69. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*. 2018 Sep;3(3).
70. Prasad S, Wong RCW. Unraveling the mechanical strength of biomaterials used as a bone scaffold in oral and maxillofacial defects. *Oral Science International*. 2018 Jul;15(2).
71. Singh G, Soundarapandian S. Bone-like structure by modified freeze casting. 2020;1–6.

72. Alexandru Grumezescu. Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials. 1st ed. Vol. 5. ELSEVIER; 2016.
73. Eltom A, Zhong G, Muhammad A. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*. 2019 Mar 7;2019.
74. Eltom A, Zhong G, Muhammad A. Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*. 2019 Mar 7;2019.
75. Manoukian OS, Sardashti N, Stedman T, Gailiunas K, Ojha A, Penalosa A, et al. Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In: *Encyclopedia of Biomedical Engineering*. Elsevier; 2019.
76. Ghalia MA, Dahman Y. Advanced nanobiomaterials in tissue engineering. In: *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering*. Elsevier; 2016.
77. Prasad S, Kumar V, Kirubanandam S, Barhoum A. Engineered nanomaterials: nanofabrication and surface functionalization. In: *Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures*. Elsevier; 2018.
78. Garg T, Singh O, Arora S, Murthy RSR. Scaffold: A Novel Carrier for Cell and Drug Delivery. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2012;29(1).
79. Ye, Kuang, You, Morsi, Mo. Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering with Drug Loading and Release. *Pharmaceutics*. 2019 Apr 15;11(4).
80. Moreno Madrid AP, Vrech SM, Sanchez MA, Rodriguez AP. Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*. 2019 Jul;100.
81. Yang Y, Wang G, Liang H, Gao C, Peng S, Shen L, et al. Additive manufacturing of bone scaffolds. *International Journal of Bioprinting*. 2018 Dec 17;5(1).
82. Lutzweiler G, Ndreu Halili A, Engin Vrana N. The Overview of Porous, Bioactive Scaffolds as Instructive Biomaterials for Tissue Regeneration and Their Clinical Translation. *Pharmaceutics*. 2020 Jun 29;12(7).
83. Ruiz-Aguilar C, Olivares-Pinto U, Drew RAL, Aguilar-Reyes EA, Alfonso I. Progen Effect on Structural and Physical Properties of  $\beta$ -TCP Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *IRBM*. 2020 May;
84. Asadi N, del Bakhshayesh AR, Davaran S, Akbarzadeh A. Common biocompatible polymeric materials for tissue engineering and regenerative medicine. *Materials Chemistry and Physics*. 2020 Feb;242.
85. Malikmammadov E, Tanir TE, Kiziltay A, Hasirci V, Hasirci N. PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2018 Jun 13;29(7–9).

86. Mondal D, Griffith M, Venkatraman SS. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2016 Mar 23;65(5).
87. Abbasi N, Hamlet S, Love RM, Nguyen N-T. Porous scaffolds for bone regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. 2020 Mar;5(1).
88. Zhu L, Luo D, Liu Y. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration. *International Journal of Oral Science*. 2020 Dec 6;12(1).
89. Hutmacher DW, Woodfield TBF, Dalton PD. Scaffold Design and Fabrication. In: *Tissue Engineering*. Elsevier; 2014.
90. Metwally S, Ferraris S, Spriano S, Krysiak ZJ, Kaniuk Ł, Marzec MM, et al. Surface potential and roughness controlled cell adhesion and collagen formation in electrospun PCL fibers for bone regeneration. *Materials & Design*. 2020 Sep;194.
91. Zhang K, Fan Y, Dunne N, Li X. Effect of microporosity on scaffolds for bone tissue engineering. *Regenerative Biomaterials*. 2018 Mar 1;5(2).
92. Wei S, Deng Y, Liu X, Xu A, Wang L, Luo Z, et al. Effect of surface roughness on osteogenesis in&nbsp;vitro and osseointegration in vivo of carbon fiber-reinforced polyetheretherketone&ndash;nanohydroxyapatite composite. *International Journal of Nanomedicine*. 2015 Feb;
93. Krebs MD, Sutter KA, Lin ASP, Guldborg RE, Alsberg E. Injectable poly(lactic-co-glycolic) acid scaffolds with in situ pore formation for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2009 Oct;5(8).
94. Abbasi N, Ivanovski S, Gulati K, Love RM, Hamlet S. Role of offset and gradient architectures of 3-D melt electrowritten scaffold on differentiation and mineralization of osteoblasts. *Biomaterials Research*. 2020 Dec 3;24(1).
95. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold Design for Bone Regeneration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2014 Jan 1;14(1).
96. Shi R, Huang Y, Ma C, Wu C, Tian W. Current advances for bone regeneration based on tissue engineering strategies. *Frontiers of Medicine*. 2019 Apr 25;13(2).
97. Sola A, Bertacchini J, D'Avella D, Anselmi L, Maraldi T, Marmioli S, et al. Development of solvent-casting particulate leaching (SCPL) polymer scaffolds as improved three-dimensional supports to mimic the bone marrow niche. *Materials Science and Engineering: C*. 2019 Mar;96.

98. Faia-Torres AB, Charnley M, Goren T, Guimond-Lischer S, Rottmar M, Maniura-Weber K, et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in the absence of osteogenic supplements: A surface-roughness gradient study. *Acta Biomaterialia*. 2015 Dec;28.
99. Liverani L, Roether JA, Boccaccini AR. Nanofiber composites in bone tissue engineering. In: *Nanofiber Composites for Biomedical Applications*. Elsevier; 2017.
100. Abbasi N, Hamlet S, Love RM, Nguyen N. Journal of Science : Advanced Materials and Devices Porous scaffolds for bone regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* [Internet]. 2020;5(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.01.007>
101. Bhardwaj P, Rai DV, Garg ML. Zinc inhibits ovariectomy induced microarchitectural changes in the bone tissue. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*. 2016 Mar;3.