



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ANDAMIOS IMPRESOS EN 3D CON POROSIDAD
HETEROGÉNEA PARA REGENERACIÓN ÓSEA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N A D E N T I S T A

P R E S E N T A:

MARIANA ELIZABETH SILVA TORRES

TUTOR: Dra. JANETH SERRANO BELLO

ASESOR: Dra. LUCÍA PEREZ SANCHEZ

MÉXICO, Cd. Mx.

2024



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.

INDICE

1. Introducción	4
2. Marco teórico	5
2.1 Regeneración Ósea	5
2.1.1 Defectos óseos en zona craneomaxilofacial	6
2.1.2 Labio paladar hendido	7
2.1.3 Micrognatismo maxilar y mandibular	8
2.1.4 Prognatismo mandibular	9
2.1.5 Microsomía Hemifacial	10
2.1.6 Craneosinostosis	12
2.1.7 Hendiduras craneofaciales	13
2.1.8 Ameloblastoma mandibular	13
2.1.9 Defecto óseo dental	14
2.2 Bioingeniería de tejidos	14
2.2.1 Biomateriales	15
2.2.2 Ácido Poliláctico (PLA)	18
2.2.3 Impresión 3D	20
2.2.4 Uso de modelo animal en la ciencia	21
3. Planteamiento del problema y justificación	25
4. Hipótesis	25
5. Objetivos	26
5.1 Objetivos generales	26
5.2 Objetivos específicos	26
6. Material y Método	26
6.1 Clasificación del Tipo de Estudio	30
6.2 Universo de Estudio	30
6.3 Muestra	30
6.4 Variables	31
6.5 Diseño Estadístico	31
7. Resultado	32
8. Discusión	44
9. Conclusión	46
10. Aspectos Éticos y Legales	46
11. Referencias	47

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que gracias a sus incontables esfuerzos soy la calidad de ser humano que soy hoy en día; a mi padre (el güero) que en ningún momento y bajo ninguna circunstancia, por muy difícil que esta fuera, dejo de creer en mí, en mi potencial y en que podría llegar a conseguir grandes cosas, por siempre impulsarme a ser una mejor mujer y ser independiente; a mi madre que ha estado en mis tristezas y mis alegrías siempre siendo un apoyo en cada momento de mi vida; a mis hermanos que han cuidado de mi como un padre, que siempre han estado para darme un consejo y ser mi mayor y más grande ejemplo a seguir, porque sin ninguno de ustedes no podría estar en el lugar en el que estoy, todo su amor, paciencia, tiempo y aprendizajes me han traído hasta aquí y es para ustedes que dedico cada logro y cada éxito.

A la Dra. Silvia, por confiar en mí y ver mi potencial desde que estaba en segundo año, porque sin su ayuda no hubiera llegado al increíble laboratorio de bioingeniería de tejidos, porque cada palabra de aliento que me dedico me hizo cambiar mi perspectiva de la vida y darme cuenta de que iba por el camino correcto, que no debía presionarme y debía disfrutar de cada paso que daba, siempre con una sonrisa.

A la Dra. Janeth por que más que ser mi tutora y mi maestra ha sido una guía en medio de todo este camino, cuando sentía que estaba en un callejón sin salida simplemente me escuchó y me enseñó como siempre, pese a todo, se puede salir adelante siempre con una sonrisa, con una vibra bonita y con paz en el corazón, porque siempre todo tiene una solución.

A mi mejor amiga Lizbeth, porque con ella viví toda esta experiencia de la carrera desde el día uno, sin saber, que se volvería una pieza fundamental en cada año de nuestra vida escolar, porque cuando más desanimada me sentí siempre estuvo conmigo, en las buenas, en las malas, en las peores y en las mejores, porque siempre fuimos juntas de la mano en toda esta trayectoria y me hiciste la vida más amena, más alegre y llena de sonrisas.

A mi mejor amigo Armando S, por siempre ponerme los pies sobre la Tierra, por alentarme día con día, por siempre darme una opinión realista sobre las cosas

que pasaban a mi alrededor y tenerme la paciencia más grande del mundo. Gracias por siempre estar, por regalarme sonrisas y consejos que me llevaron a la mayoría de las veces tomar el camino correcto para lo que estaba pasando en cada etapa de este largo camino.

A la Dra. Lucy (lucecita) siempre te dije lucecita de cariño por que en realidad es lo que has representado en mi camino, has sido una lucecita en mi vida desde que llegaste a ella, llenado todo mi mundo de sabiduría y no solo en el ámbito escolar, siempre tuviste un consejo, una solución o simplemente estuviste ahí en todo momento, y sin ti, llegar a este punto no hubiera sido posible por que literalmente salvaste mi vida junto con Mar y estaré eternamente agradecida de que fueras tú la que estuviera en esos momentos.

A mi amiga Mar por que en cada día que has estado en mi vida ha habido sonrisas y mil y un chistes por contar, por haber salvado mi vida literalmente y estar en cada momento, en los más alegres y en los más tristes, siendo un bebé elocuente y recordándome lo valiosa que soy cuando parece que lo había olvidado por completo, por estar a mi lado sonriendo o coexistiendo, por haberme brindado tanta felicidad y paz con tu presencia sin importar donde estuviéramos.

Agradecimientos especiales al programa DGAPA-UNAM-PAPIIT-IN218223.

A todos y cada uno de ustedes les agradezco por estar y permanecer en mi camino, los amo.

La constancia es la base del éxito.

1.Introducción

En la actualidad, el área de la salud nos exige avanzar de manera acelerada debido a las condiciones multifactoriales que presentan nuestros pacientes hoy en día, es por ello por lo que, debemos implementar día con día diferentes tipos de materiales en los tratamientos de nuestros pacientes, personalizando el tipo de material de manera que puedan ser útiles para la regeneración, sustitución de tejidos u órganos dañados o perdidos, por alguna enfermedad, trauma o de manera congénita.

En el laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM, se busca modificar andamios, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. El objetivo de la ingeniería de tejidos es recopilar ideas o teorías que restauren, mantengan o mejoren los tejidos dañados u órganos completos. Han sido aprobados por la FDA (U.S Food & Drug Administration) la conformación de diversos tipos de materiales y tejidos para los distintos tipos de defectos óseos en los pacientes, mediante la caracterización física, química y biológica de la reacción de los diferentes componentes poliméricos para el tratamiento de defectos óseos críticos en ratas *Wistar*.

Es por ello que en este trabajo nos centramos en la regeneración ósea de defectos de tamaño crítico de 9mm de diámetro en calvaria de ratas *Wistar* con la finalidad de demostrar que los andamios con porosidad heterogénea impresos en 3D con material biocompatible como lo es el PLA, será una herramienta valiosa a la hora de tratar a nuestros pacientes, no solo en el área odontológica sino en las diversas ramas de la medicina para futuras reconstrucciones a nivel óseo.

2.Marco teórico

2.1 Regeneración Ósea

Ante cualquier agresión en el cuerpo humano que involucra la pérdida de algún líquido o sustancia del mismo, este responderá con un proceso de restauración del tejido afectado, dando paso a la formación de los coágulos sanguíneos que se va diferenciando en un tejido fibroso el cual rellena el defecto. De esta manera el tejido que fue afectado no conservará la forma ni la función original, y sus propiedades y características no serán iguales con las ya preexistentes dando paso a la reparación total del tejido ⁽¹⁾.

Al igual que la regeneración de los demás tejidos del organismo, la regeneración del tejido óseo tiene 3 puntos:

- Existencia de células preexistentes
- Presencia de matriz extracelular insoluble
- Moléculas reguladoras

De los cuales surgen 3 fases importantes para dicha consolidación ósea:

- Fase inflamatoria- proliferativa
 - Migración de células a la zona del daño por factores químicos liberados en el momento del impacto.
 - Multiplicación de las células en respuesta a las señales químicas liberadas a la hora del trauma.
 - Acumulación de líquido en el espacio intracelular y aumento de la permeabilidad capilar, que produce un edema alrededor de la zona afectada y todos los signos de inflamación. La presencia de inflamación ayudará a los tejidos a manera de que se puedan ir limpiado de algún tejido necrótico. En el periodo de los días 4 y 21 se manifestarán brotes vasculares que irán ocupando el foco la zona afectada, por lo que aumentará evidentemente la vascularización de la zona. Pasadas 3 semanas dicho proceso cederá. ⁽¹⁾.

- Formación del callo óseo
 - Durante esta fase proliferan las células en el periostio, en los tejidos blandos y en todo el tejido vascularizado circundante y comienzan a diferenciarse en osteoblastos, osteoclastos y condroblastos. Las células del periostio proliferarán buscando así la unión de los fragmentos de dicha fractura dando así una capa perióstica que recubrirá al callo óseo blando a manera de protección ⁽¹⁾.

Al finalizar esta etapa se comenzará con la mineralización del callo óseo, está se produce gracias a que cristales de hidroxiapatita son depositados en dicho callo llevándolo así a la formación de tejido osteoide que irá materializando ⁽¹⁾.

- Remodelación
 - En este proceso de consolidación intervienen diversos factores: el celular, de vascularización, los bioquímicos del organismo, bioquímicos locales y biofísicos.

Si la zona lesionada no está vascularizada nunca se podrá producir la regeneración ósea adecuada, ya que para este proceso se lleva a cabo muchas actividades metabólicas que implican la reparación tisular y estas no pueden proceder al no tener la cantidad de oxígeno suficiente ⁽¹⁾.

2.1.1 Defectos óseos en zona craneomaxilofacial

Se le llama defecto óseo a toda aquella anomalía en la anatomía normal de un hueso, esta puede estar dada por diversos factores, por mencionar algunos ^(2,6):

- Secuelas de labio paladar hendido
- Micrognatismo maxilar
- Prognatismo mandibular
- Micrognatismo mandibular
- Malformaciones congénitas
 - Microsomía Hemifacial

- Craneosinostosis
- Hendiduras craneofaciales
- Secuelas de fracturas faciales
- Fracturas craneofaciales
- Heridas por armas de fuego
- Tumores benignos en huesos de la cara
- Tumores malignos en huesos de la cara
- Tumores malignos en piel con compromiso óseo
- Ameloblastoma mandibular

2.1.2 Labio paladar hendido

Las alteraciones bucofaciales de labio y paladar hendido (LPH) se considera que afectan a 1 de cada 600 neonatos en el mundo y es el segundo defecto de nacimiento más frecuente, además presentar mayor incidencia en el sexo masculino ^(8,9).

Diversas fuentes señalan que, en el mundo, cada tres minutos nace un niño con una deformidad bucolabial hereditaria; de los que, 1 de cada 10 morirá antes de cumplir el año de nacido, debido a las dificultades para alimentarse ^(10,11). En relación con esas entidades, las características esqueléticas resultan de gran interés para establecer tratamiento.

Durante la quinta semana de gestación el ectodermo formará cinco prominencias alrededor de la cavidad oral primitiva, siendo estas las prominencias frontonasales, maxilares y mandibulares. Una vez formadas se produce un engrosamiento de las placodas nasales.

En la sexta semana, se formará la línea media de la nariz, el labio superior, el filtro, los incisivos y el paladar primario, el proceso nasal lateral, la base y el ala de la nariz. También en este tiempo se lleva a cabo, la estructuración de la parte lateral del labio superior, una parte del maxilar y el paladar secundario ⁽¹²⁾.

Desde la quinta hasta la doceava semana de gestación habrá la presencia de células provenientes del mesodermo craneal; mientras tanto la mandíbula crece

hacia adelante y abajo, la posición de la lengua baja, los estantes palatinos se osificarán para poder formar maxilar de su lado palatino. También la capa basal será parte de la zona media de las bases palatinas; mientras, las bases palatinas crecen unas sobre otras, acercándose para formar una sutura media y posterior se deforma creando células mesenquimatosas entre las bases palatinas y el cierre de las bases palatinas se produce detrás del foramen incisal, al mismo tiempo en que se unen el tabique y el paladar primario. Es entonces, donde se debería de osificar el proceso palatino maxilar para poder formar el paladar blando con la úvula, pero este no se osifica. Es en la novena a la doceava semana donde este proceso no puede concluir dando paso a dicho trastorno por factores genéticos, mecánicos o teratogénicos ⁽¹²⁾.

2.1.3 Micrognatismo maxilar y mandibular

Durante el crecimiento y desarrollo del niño pueden aparecer desarmonías esqueléticas a nivel del macizo craneofacial. ⁽¹⁴⁾ Las maloclusiones son la 3ra causa en problemas bucales en el mundo y, aunque no son consideradas una enfermedad, se debe priorizar su atención, dada su incidencia e importancia en el desarrollo craneofacial de los pacientes. ⁽¹⁵⁾

Podemos definir a las maloclusiones transversales como a todos aquellos cambios únicamente en los planos horizontales y/o transversales, siendo completamente independientes de los planos sagital y vertical ⁽¹⁶⁾.

El micrognatismo transversal es una anomalía dentomaxilofacial caracterizada por malas relaciones entre las arcadas dentarias, generalmente debido a la presencia de cambios en el tamaño, posición, forma o número de los dientes, maxilares y articulaciones temporomandibulares. Su prevalencia está asociada a la aparición de problemas de salud bucal, estética, aspectos psicosociales y su impacto en la calidad de vida del paciente. ⁽¹⁷⁾

La prevalencia de maloclusiones en los dientes temporales es de aproximadamente el 20%, pero este número puede aumentar hasta un 60% durante la erupción de los dientes permanentes. A nivel internacional puede tener una prevalencia del 41 y 97% ⁽¹⁸⁾.

2.1.4 Prognatismo mandibular

Esta malformación aparece por la diferencia y no concordancia de la zona anteroposterior de la mandíbula y el maxilar, es por esto que dichos huesos no se encuentran en la misma línea.

El caso del prognatismo mandibular es que la mandíbula presenta mayor tamaño en proporción al maxilar y el arco dentario inferior se pone hacia adelante con relación al superior, dando como resultado una maloclusión Clase III o también llamada underbite ^(19,20).

La clase III o underbite es una de las maloclusiones más severas, aunque únicamente se le considerará como trastorno si influye en la masticación, el habla o en el ámbito social debido a un gran impacto estético ^(19,20).

El prognatismo está asociada a malformaciones únicamente genéticas, aunque su etiología puede llegar a considerarse multifactorial. Así, una combinación de herencia y ambiente puede potenciar o disminuir la maloclusión.

Entre los factores ambientales que intervienen, podemos mencionar hábitos orales, hipertrofia de amígdalas o de adenoides, pérdida prematura de piezas dentales temporales, alteraciones endocrinas, etc ^(19,20).

Según estos factores, la malformación se manifiesta de distintas formas:

- Cuando el hueso de la mandíbula presenta mayor tamaño en proporción al maxilar, conocido como clase III esquelética.
- Cuando la mandíbula con tamaño desproporcional es por algún problema dental, es decir, por algún tipo de apiñamiento.
- Cuando el paciente cuenta con un mentón hipertrofiado puede presentar un aspecto prognata, aunque este no sea una Clase III real ⁽¹⁹⁻²⁰⁾.

2.1.5 Microsomía Hemifacial

La microsomía hemifacial (HFM) corresponde a un espectro de malformaciones craneofaciales congénitas caracterizadas por hipoplasia de tejidos con origen embriológico en el primer y segundo arcos branquiales. Su expresión es muy variable, incluso con defectos de corazón, columna y sistema nervioso central.

Es la segunda malformación craneofacial más común después del labio y paladar hendido, con una incidencia estimada de 1/5.600 nacimientos ⁽²¹⁾. Aparece unilateral en el 70% de los casos, y su forma bilateral suele ser asimétrica, afectando más a un lado que al otro ⁽²²⁾.

Su patogenia responde a diferentes teorías. ^(23,24) Una de ellas ha sido sugerida por Poswillo, quien afirma que una de las causas podría ser el cambio vascular que provoca sangrado durante la formación embrionaria de la arteria estapedial, así como alteraciones en el desarrollo del primer y segundo arcos branquiales. El resultado del tamaño del hematoma y la lesión tisular explicaría la morfología y las diferentes variaciones de la HFM en los modelos experimentales, siendo así que en la presencia de un mayor tamaño habrá mayores alteraciones en el desarrollo de los arcos branquiales. ⁽²⁵⁾ Otra teoría ha sido postulada por Johnston, ⁽²⁶⁾ quien nos dice que una causa sería una alteración en la manera que las células migran a la cresta neural favoreciendo la formación del ganglio del trigémino. Esta mala migración y ausencia de interacción entre la mesénquima y las células de la cresta neural, se ha asociado con otros problemas en pacientes con HFM, como microdoncia e hipodoncia, ⁽²⁷⁾ y problemas cardíacos ⁽²⁸⁾. Otros autores sugieren esta relación entre falta de migración de células de la cresta neural y HFM porque en ausencia de estas células hay menos factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Dicho factor ayuda al crecimiento promoviendo la proliferación del cartílago de Meckel y la ausencia de VEGF en la hipoplasia mandibular ⁽²⁹⁾.

Si bien su etiología aún se desconoce, se han descubierto varios factores relacionados al ambiente y la genética. Dentro de las causas ambientales, están asociados los medicamentos vasoactivos durante el embarazo, ⁽³⁰⁾ sangrado vaginal durante el segundo trimestre, múltiples embarazos llegados a término,

(31) uso de reproducción in vitro por parte de la madre (32) y preexistencia o gestacional diabetes (33-35).

Una de las causas genéticas está asociada al componente autosómico dominante (asociado al cromosoma 14), (36-38) y alteraciones cromosómicas, principalmente en los cromosomas 5 (delección 5p), (38) (trisomía) y 22 (delección 22q11.2), entre otros (39,41).

La planificación del tratamiento depende del tipo de malformación y la gravedad en su manifestación, teniendo siempre presente las expectativas realistas del paciente y la familia hablando del resultado final.

Con el uso de ortodoncia y la cirugía plástica/ortognática, el tratamiento busca mejorar la función y estética de la cara brindándole mayor simetría facial, con el fin de: (42,43)

1. Aumentar el lado mandibular afectado, así como sus tejidos blandos.
2. En caso de ausencia de la ATM, crear una articulación que simule dicha parte.
3. Corregir deformidades secundarias en maxilar.
4. Lograr una oclusión óptima y funcional, así como una estética facial y dental.
5. Mejorar y poner en horizontal el plano oclusal.
6. Lograr la correcta apertura de la boca si es limitada.

2.1.6 Craneosinostosis

La craneosinostosis proviene del cierre prematuro de 1 o más suturas craneales ⁽⁴⁵⁾. El término craneostenosis, se refiere al problema existente con relación al espacio ⁽⁴⁶⁾, teniendo una mayor prevalencia en hombres.

Las suturas craneales nos ayudan a delimitar las placas óseas del cráneo y permiten el crecimiento en los primeros 2 años de vida, siendo independiente el crecimiento del cerebro. La fusión temprana de las suturas craneales altera el crecimiento normal del cráneo, produciendo malformaciones anatómicas peculiares de una craneosinostosis ⁽⁴⁷⁾.

La clasificación de la craneosinostosis puede ser por la forma adquirida del cráneo, la presencia de una o varias suturas afectadas, si está asociada alguna malformación preexistente (sindromática vs no sindromática), etc.

Algunos de los factores que incrementan el riesgo de presentar craneosinostosis pueden llegar a ser embarazos múltiples llegados a término, cesáreas, presentación en podálica, diabetes gestacional y oligohidramnios ⁽⁴⁸⁾.

La forma de la cabeza alargada provocada por el cierre prematuro de la sutura sagital presentando una elevación en la frente se le denomina escafocefalia ⁽⁴⁹⁾.

La forma de la cabeza corta en su parte anterior y posterior es provocada por el cierre de ambas suturas coronales, presentando una fontanela anterior abierta o en algunos casos, a esta forma se denomina braquicefalia.

La forma triangular de la cabeza con una frente igualmente triangular se deberá al cierre de la sutura metópica, la cual se denomina trigonocefalia ⁽⁴⁹⁾.

2.1.7 Hendiduras craneofaciales

La suposición de que la GMD se asocia con una mayor aparición de síndromes y malformaciones que están relacionados a la presencia de hiperglucemia en las primeras etapas del embarazo. Esto nos dice que un descuido glucémico durante el embarazo aumentará el riesgo considerablemente para favorecer malformaciones ⁽⁵⁰⁾. Sin embargo, aún es controvertido si los niveles severos de hiperglucemia están asociados a eventos adversos en esta etapa.

Además de la hiperglucemia, el consumo de drogas durante el embarazo representa un de los más altos indicativos de riesgo para la aparición de diversos problemas, incluidas las hendiduras orofaciales ⁽⁵¹⁾ y denota uno de los problemas sociales más importantes a nivel mundial ⁽⁵²⁾.

Las anomalías congénitas son extremadamente variables tanto en el tipo como en lo que las ocasiona. Las hendiduras orofaciales (COF) son malformaciones que pueden identificarse por la falta de continuidad de los labios superiores, reborde alveolar superior y paladar posiblemente afectando de forma parcial o total dichas estructuras ⁽⁵³⁾.

Su etiología es compleja y multifactorial. La parte genética, ambiental o la interacción de ambos pueden interferir con el embarazo causando anomalías. La parte genética está representada por los genes IRF6, MSX1, FOXE1, MTHFR C677T, FAF1 y TGFB ^(54,55). Entre los factores ambientales se encuentran el estado de salud materno en el momento de la gestación, si existe el consumo de tabaco y/o alcohol durante el embarazo, exposiciones a disolventes y pesticidas, exposición a rayos X, enfermedades adquiridas por la madre en el embarazo, incluida la diabetes mellitus, epilepsia e infecciones virales y el uso por prescripción médica de algunos medicamentos como las benzodiazepinas y los corticosteroides ^(56,57).

2.1.8 Ameloblastoma mandibular

El carcinoma ameloblástico es un tumor maligno, agresivo y que puede llegar a tener una incidencia menor al 2 % de los tumores odontogénicos ⁽⁵⁹⁾. Se identifica por contar con una atipia citológica, poca diferenciación e índice de mitosis alto, siendo indiferente si existe una metástasis o no ⁽⁶⁰⁾. Puede presentarse sin

antecedentes o a partir de ameloblastomas preexistentes. Hablando clínicamente es un tipo de tumor de rápido crecimiento y que en algunos casos puede presentar dolor, ulceración, trismus y/o parestesia ^(61,62). Al ser un tipo de tumoración poco frecuente se tiene un conocimiento limitado en cuanto a su comportamiento.

2.1.9 Defecto óseo dental

Se le denomina defecto óseo dental a la pérdida del soporte alveolar ya sea horizontal o verticalmente, siendo así clasificados por su nivel de severidad y número de paredes perdidas. Los defectos óseos horizontales son los más comunes, por otro lado, los defectos óseos verticales o también llamados angulares se clasificarán de acuerdo con el número de paredes siendo de una, dos o tres paredes ⁽⁶³⁾.

2.2 Bioingeniería de tejidos

La bioingeniería de tejidos es una disciplina relativamente nueva que se relaciona con la biología celular y la ingeniería con materiales biocompatibles, como se muestra en la figura 1, siendo así un campo de amplio y de acelerado desarrollo, buscando la combinación de andamios, células y moléculas biológicamente activas. La bioingeniería de tejidos recurre al trasplante de células, algunas ciencias aplicadas y la ingeniería, todo esto con el objetivo de desarrollar diversos sustitutos naturales y artificiales que nos ayuden a restablecer, mantener o si es el caso, mejorar la función de un órgano o tejido completo o parcialmente dañado. Por ello es que también es de suma importancia mantener el enfoque en los métodos y técnicas de creación para el reemplazo de estas células. Esta área ha demostrado su potencial principalmente en 3 áreas, las cuales son: Impresión 3D de andamios, tejidos u órganos humanos, la reprogramación celular y su desarrollo y empleo de biomateriales para lograr su fin ^(4,7).

Al ser una rama de constante avance y manteniéndose a la vanguardia para nuestros tiempos, la bioingeniería de tejidos ha logrado llamar la atención no solo

de personas del campo de trabajo sino de muchísimo más público que está a la espera de que muchos trabajos puedan emplearse en pacientes, dando así mayor difusión al área y siendo de mayor interés para todo el público (4,7).

En el área odontológica se ha podido emplear andamios en defectos de cabeza y cuello, dando énfasis en defectos óseos, ya sea de tamaños críticos o no que hayan sido propiciados por una enfermedad adquirida o congénita (4,7).

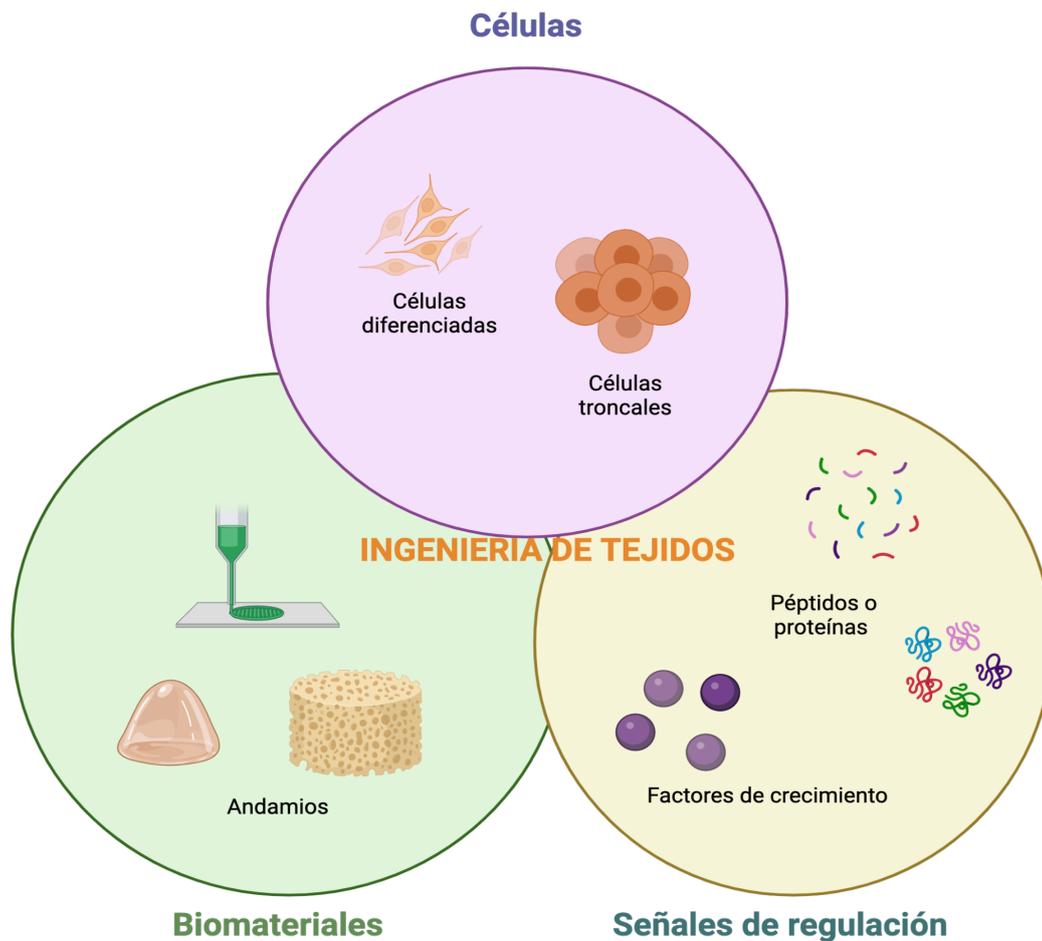


Figura 1. Triada de los componentes en bioingeniería de tejidos, fuente propia.

2.2.1 Biomateriales

Los biomateriales son utilizados para la creación de andamios o estructuras con poros que nos ayuden a la correcta integración de una estructura anatómica propia del tejido que requiere regenerarse, estos andamios deberán contar con una matriz biocompatible y biodegradable, siendo apto para alojar y ayudar al crecimiento, reproducción y renovación de las células agregadas a su matriz y a la vez ser totalmente capaz de ser eliminado por el metabolismo del tejido que albergó (4,64).

Los materiales utilizados para implantes e interacción directa con tejido biológico deben cumplir con propiedades de biocompatibilidad, es decir, que no produzca algún efecto tóxico y que a la vez esté interactúe química y físicamente con el tejido, además, las propiedades mecánicas del andamio deben ser suficientes y no colapsar durante la manipulación en actividades normales del paciente.

En la actualidad, los materiales utilizados para andamios son los polímeros naturales y sintéticos. Los polímeros sintéticos pueden ser producidos bajo condiciones controladas y por lo tanto exhiben en las propiedades mecánicas y físicas predecibles y reproducibles generales, tales como resistencia a la tracción módulo elástico y la tasa de degradación ⁽⁶⁴⁾.

Los biopolímeros tienen una gran utilidad en el área de médica para prótesis temporales, andamios, como vehículos de liberación controlada de fármacos y como agentes de sutura, fijación y adhesión. Unos de los biopolímeros más utilizados es el ácido poliláctico, el quitosano, al ácido poliglicólico y la policaprolactona. Los materiales reabsorbibles, han sido de gran interés para diversos investigadores, ya que se eliminan sin necesidad de cirugía. Estos materiales tienen la característica de que pueden eliminarse sin ser tóxicos para el cuerpo y se degradan a la mitad de su tamaño inicial en un lapso muy corto ⁽⁶⁴⁾.

Existen diversos tipos de biopolímeros, pero uno que cuenta con diversas características son los llamados biopolímeros inteligentes, que por mencionar algunas de ellas son que no son trombogénicos, son fuertes en su estructura pero a la vez flexibles, resistentes y fáciles de moldear. Todas estas características nos han ayudado para que sean utilizados en distintas áreas como lo son la ingeniería de tejidos, ingeniería de tejidos óseos, endotelización 3D, venas sanguíneas artificiales, patrón de células 3D, liberación de fármacos, ortodoncia, cicatrización y cierre de heridas, microcirugías, materiales anticonceptivos, dispositivos de reparación vascular y stents para tratamiento de aneurisma, entre otras ⁽⁶⁴⁾.

Los biopolímeros también deben contar con otras propiedades como ser biodegradable, esto quiere decir que debo poder eliminarse; biocompatible lo

cual hace referencia a que no debe ocasionar reacciones; bioadhesividad y hemocompatibilidad ⁽⁶⁴⁾.

A la hora de la fabricación de los andamios se deben tener en cuenta varios puntos, como que tan geométrico será nuestro andamio a manera que nos permita la buena dirección de regeneración tisular, es por esto que existen muchos tipos de biopolímeros para la adaptación de acuerdo a las necesidades del operador, algunos de ellos son los siguientes:

- Polisacáridos
 - Celulosa
 - Agar
 - Alginato
 - Ácido hialurónico
 - Quitina
 - Xantano
- Proteínas
 - Seda
 - Colágeno
 - Grenetina
 - Soya
 - Elastina
- Polinucleótidos
 - Adhesivos
 - Ácido poliláctico
 - Ácido poli-gamma glutámico
 - Caucho natural
 - Polímeros sintéticos de grasas naturales y aceites

Micropartículas y nanopartículas basadas en polímeros han sido objeto de investigación en el sector farmacéutico en las últimas décadas ⁽⁶⁴⁾.

Entre los biopolímeros más utilizados se puede mencionar al ácido poliláctico, el quitosano, al ácido poliglicólico y la policaprolactona ⁽⁶⁴⁾.

Sin embargo, a nivel biomédico resalta el uso del poliácido láctico (PLA) respectivamente. Este polímero sintético es un excelente candidato para hueso,

cartilago y tejidos en ingeniería de tejidos debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad, así como la facilidad de la fabricación y costo. Sin embargo, debemos construir un andamio con una porosidad adecuada, ya que será la que nos ayudará a favorecer el crecimiento óseo dando una fijación reparación osteointegrada óptima para nutrir la zona y tener éxito en el procedimiento ⁽⁶⁴⁾.

Por tal motivo se eligió la técnica de impresión 3D por FDM capa por capa la cual ha demostrado ser exitosa al momento de crear piezas resistentes, duraderas y dimensionalmente estables a la hora de ser precisos, que es de nuestro interés para el fin de este desarrollo de andamio.

Los andamios de PLA impresos en 3D por FDM capa por capa permiten obtener estructuras reproducibles en un lapso corto, así mismo han demostrado tener una buena respuesta de biocompatibilidad, no tóxicos para las células y han presentado superficies que pueden llegar a facilitar la adhesión, nutrición y proliferación celular ⁽⁶⁴⁾.

2.2.2 Ácido Poliláctico (PLA)

El ácido poliláctico se obtiene a partir del ácido láctico, un producto natural, como resultado de la fermentación de algunos vegetales como el maíz como podemos observar en la figura 2. A este lo componen diversos isómeros que dependiendo cual sea será el tipo de PLA, un ejemplo es el isómero D, el isómero L o una mezcla DL. Cuando polimerizamos el ácido láctico podemos controlar diversos factores para de alguna manera moldear dicho biopolímero llevándolo a diversos pesos moleculares y grados de cristalinidad. Esto lo podemos lograr si hacemos la correcta selección de parámetros como puede llegar a ser la presión, temperatura, tiempo y tipo de catalizador ⁽⁶⁵⁾.

Se ha observado que al ponerlo a temperaturas aproximadas a 150 °C y con una presión que oscile entre 40-60 Torr se obtiene PLLA de bajo peso molecular, el cual cuenta con óptimas características como son ser blandos, moldeables manualmente, perfectos para crear bloques. Por otro lado, si se despolimeriza y después se sublima esto da paso a un PLLA con un peso molecular mayor, el cual resulta apto para la fabricación de películas, tornillos y bloques duros. El PLLA ha sido aprobado por la Agencia para la Administración de alimentos y

drogas de los Estados Unidos, FDA, y por lo tanto se ha ampliado sus aplicaciones biomédicas y en empaques para alimentos ^(65,66).

El PLA se ha utilizado para diversos tipos de implantes en la ortopedia un ejemplo de estos son las placas y tornillos en el tratamiento de algunos tipos de fracturas, también se ha implementado el uso de andamios para ayudar a la formación de tejido nuevo, así mismo ha sido utilizado para rellenar defectos ⁽⁶²⁾.

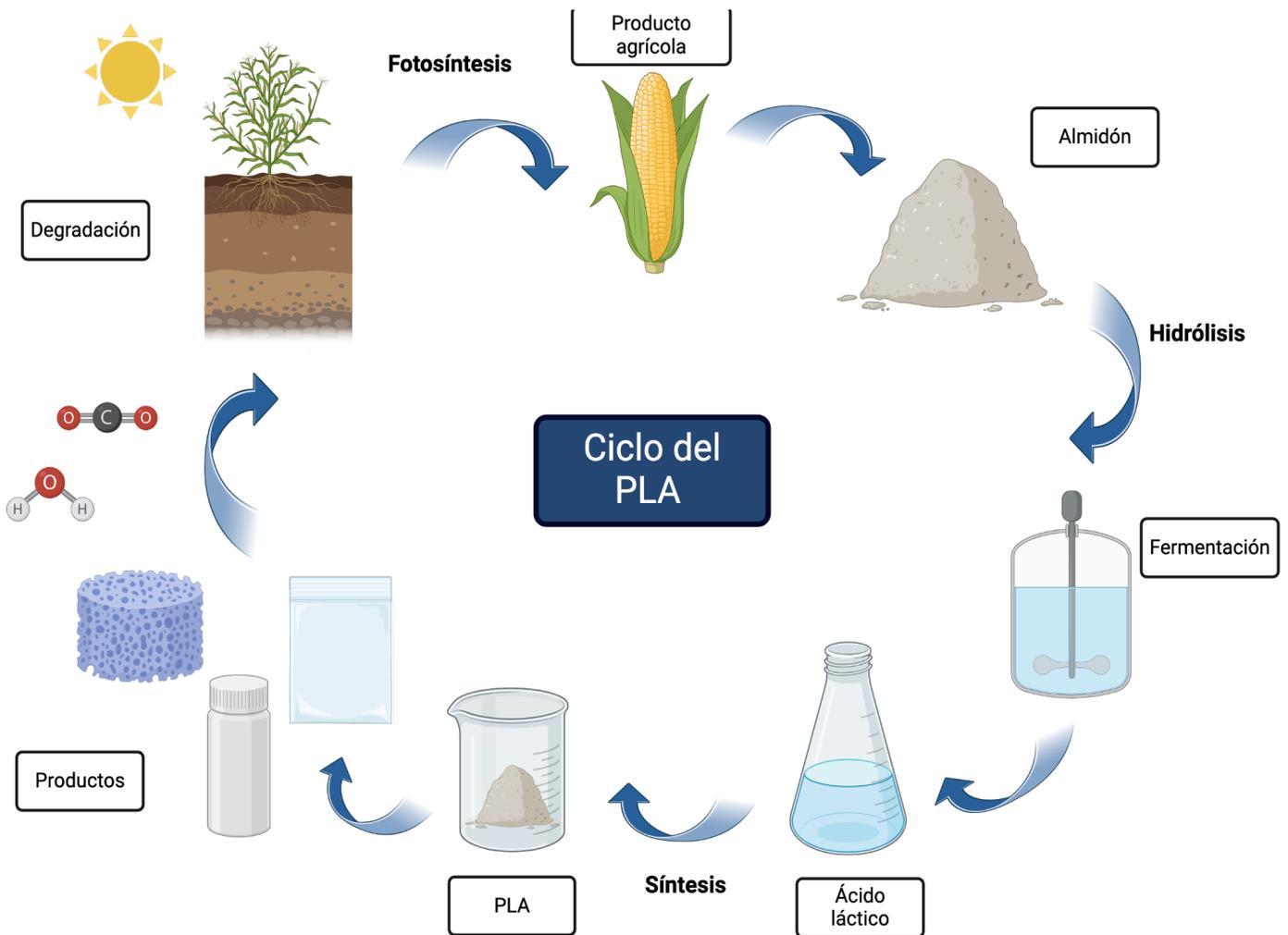


Figura 2. Proceso para la obtención del PLA ⁽⁷⁰⁾.

2.2.3 Impresión 3D

La impresión 3D es un proceso mediante el cual se crean distintos objetos de forma aditiva, es decir, poniendo material mediante un método conocido como estratificación, en el área de la salud se ha implementado la impresión 3D para crear estructuras anatómicas complejas con el fin de ensayar y planificar cirugías complejas y a su vez ayudar en la reconstrucción. Existen diversas técnicas, la elección de ellas se basará en el objetivo de cada experimento ⁽⁶³⁾.

Una de estas técnicas es la FDM o modelado por deposición fundida por sus siglas en inglés, la cual consiste en crear modelos a partir de ir derritiendo el filamento de material termoplástico y este ser extruido a manera de ir depositando capa por capa en el área de impresión hasta crear el modelo deseado (figura 3).

En esta técnica se pueden implementar diferentes materiales como el ácido poliláctico (PLA) el cuál es aprobado por la FDA.

Otra técnica es la estereolitografía (SLA) la cual utiliza luz UV para fotopolimerizar una porción de resina líquida creando así un modelo sólido y rígido. Esta es un de las técnicas más precisas que existen, sin embargo, una de sus grandes desventajas es que sus propiedades mecánicas son muy bajas. ⁽⁶³⁾.

La técnica DLP o también llamada de procesamiento digital de luz también utiliza la fotopolimerización de resina líquida para la fabricación y creación de modelos sólidos, solo que esta técnica en vez de usar luz UV utilizara solo luz de un proyector digital. Sin embargo, en algo en lo que sí se asemeja a la técnica anterior es que el resultado del modelo resultara con bajas propiedades mecánicas ⁽⁶³⁾.

La técnica SLM o de fusión por láser selectiva, como su nombre lo indica, utilizará láseres los cuales de manera selectiva sintetizarán los biopolímeros en polvo. Esta técnica es más utilizada solo para la creación de algunas pruebas, prototipos o piezas muy pequeñas.

La técnica de inyección de material o MJ irá depositando y la vez utilizando fotopolímeros que se activan con luz. Es mayormente utilizada con el mismo objetivo que la técnica anterior.

Por último, tenemos a la técnica BJ o de inyección de aglutinante, está técnica solo utilizará materiales líquidos a manera que irá uniendo las partes de un lecho

de polvo. Esta técnica solo se usa para la fundición de patrones y creación de prototipos en diferentes colores nítidos ⁽⁶³⁾.

Para el fin de este proyecto se tomó un diseño previamente realizado por la Dra. Lucía Pérez Sánchez del laboratorio de Bioingeniería de tejidos en el cual se revisó la literatura para poder elegir el tipo de diseño, así como el tamaño de los poros.

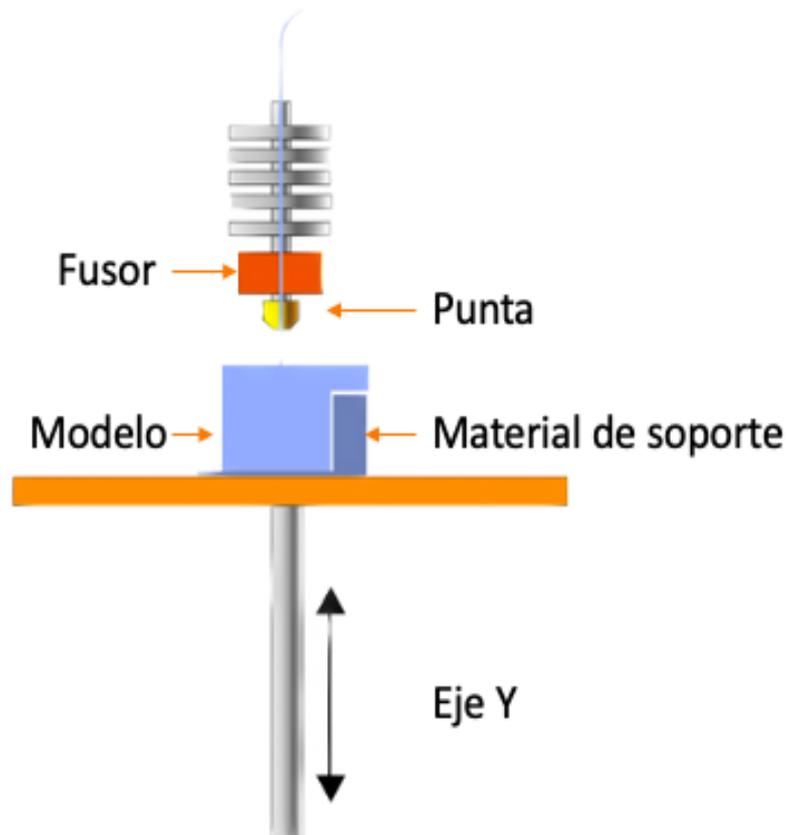


Figura 3. Imagen ilustrativa de los componentes de una impresora 3D con su modelo. Fuente propia.

2.2.4 Uso de modelo animal en la ciencia

A lo largo de los años ha sido tema de debate en la sociedad el uso de modelos animales para la ciencia (figura 4), sin embargo, mucho se ha dejado de lado sobre la importancia que esto tiene para el avance en la medicina.

Se tiene la falsa idea de que, al momento de implementar el uso de modelos animales para la ciencia, estos pasan por innumerables procesos de tortura, lo cual dista de la realidad en los laboratorios, ya que se cuentan con normas y

artículos de ética que rigen el uso, procedimientos y cuidados a utilizar para los animales, así mismo como la clasificación y permisos que estos implican dependiendo de su especie ⁽⁶⁷⁾.

Es por ello que se crearon diversas normas y códigos de ética a nivel internacional desde 1979, algunos de los principios que menciona la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 son:

Artículo 1. El avance en la medicina, el conocimiento, la biología y en los animales es necesario.

Artículo 2. Así como es necesaria la ayuda de los animales, el deber del hombre será respetarlo ya que al igual que el, es un ser viviente.

Artículo 3. El experimentador deberá estar consciente en todo momento de que el animal cuenta con sensibilidad, es capaz de sentir sufrimiento y tiene memoria, destacando que este no puede huir del dolor.

Artículo 4. El investigador es el único responsable de sus actos y decisiones tomadas durante la experimentación con animales.

Artículo 5. Las biopsias obtenidas de vertebrados vivientes deberán ser únicamente tomadas bajo la dirección de un biólogo, así mismo el mantenimiento y cuidado del animal deberá ser bajo la supervisión de un especialista.

Artículo 6. Todo estudio realizado deberá ser únicamente con la finalidad de llevarnos a una mejora tanto del hombre como de los animales.

Artículo 7. Todos los proyectos que incluyan pruebas *in vitro* deberán ser sumamente cuidadosos tratando de reducir en todo momento la cantidad de animales utilizados.

Artículo 8. Todo experimento deberá utilizar al animal que más se adapte al proyecto, siempre teniendo en cuenta que dependiendo de la especie este contará con diferentes grados sensoriales y psíquicos. Las especies en peligro de extinción solo podrán ser utilizadas en circunstancias sumamente excepcionales y específicas. Todos los animales de laboratorio deben provenir de criaderos especializados para mantener a salvo el equilibrio biológico.

Artículo 9. El investigador deberá estar consiente que debe velar en todo momento por el mantenimiento, cuidado y comodidad del animal antes, durante y después de las intervenciones durante el proyecto.

Artículo 10. En todo momento se debe evitar cualquier tipo de sufrimiento al animal, tanto físico como psíquico y nunca se deberá someter a sufrimiento innecesario, es por ello que se debe tener en cuenta los distintos métodos para minimizar riesgo y dolor ⁽⁶⁷⁾.

Actualmente en México nos seguimos conduciendo bajo esta norma la cuál como ya se mencionó cuenta con especificaciones para el uso de los animales de laboratorio ⁽⁶⁷⁾. La función de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación es impulsar la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio mediante el empleo de técnicas que garanticen la producción, la protección de la salud y el apoyo del buen uso de los animales de laboratorio. Esto con el fin de que hoy en día se lleven a cabo todas y cada uno de los puntos que nos ayuden a garantizar el buen uso y cuidado de los animales de laboratorio ya que hemos caído en la falta de planeación en la carencia de muchos ámbitos, así como las distintas opiniones que han hecho que esta práctica se ejerza de manera poco adecuada representando graves daños en el bienestar de estos. Es por ello que para lograr buenos resultados y confiables en la investigación científica, se debe optar por utilizar el menor número posible de animales, por esto mismo, los animales deben estar en condiciones favorables ⁽⁶⁷⁾.

En esta norma podemos encontrar detalladamente las condiciones con las que debe contar un bioterio en México para el uso de animales en la ciencia, así como que animales comprende la norma, como debe ser la movilización de los mismo de ser el caso y por supuesto menciona ampliamente las técnicas que se deben seguir en analgesia y anestesia, así como el procedimiento de eutanasia de los animales ⁽⁶⁷⁾.

También en ella podemos encontrar lo que se requiere para la capacitación del personal que estará en contacto con los animales así como en todo el bioterio, cabe destacar que esta norma también menciona las sanciones pertinentes en dado caso de infringir en alguno de sus puntos anteriormente mencionados el

cual nos menciona que ante la violación a alguno de los puntos ya establecidos en dicha norma, este será castigado conforme a lo que dicta la Ley Federal de Sanidad y la Ley Federal sobre Metrología y Normalización⁽⁶⁷⁾.

Por tanto, deben y es necesario utilizarse los animales como una ayuda y siempre en beneficio de la ciencia y de la salud para una mayoría, si y solo si, no puedan ser sustituidos por otras alternativas. Sin olvidar que se trata de seres vivos que sienten y sufren por lo que los investigadores estamos obligados a garantizar que los animales utilizados, estén en todo momento en las mejores condiciones y siempre siendo tratados con respeto ⁽⁶⁷⁾.



Figura 4. Uso de modelo animal en la ciencia, fuente propia.

3. Planteamiento del problema y justificación

En la actualidad no se ha fabricado algún andamio personalizado para el tratamiento de los defectos óseos que sea totalmente predecible.

Ante la existencia de los injertos ya probados como son los autoinjertos que provienen del propio individuo evitándonos así algún tipo de enfermedad infectocontagiosa así mismo como la inexistencia al rechazo del propio injerto, también están los aloinjertos que provienen de la misma especie pero genéticamente distintos aunque existe una mínima probabilidad de transmisión de enfermedades, y por último los xenoinjertos que vienen de una especie totalmente distinta como pueden ser las algas, algunos animales y el coral ⁽⁶⁸⁾. De dichos tipos de injertos existen diversas técnicas utilizadas en la odontología, como lo es la técnica onlay, la cual consiste en poner bloques de injerto ya sea extraoral o intraoral favoreciendo la corrección del defecto en grandes proporciones tanto de alto como de ancho, por otro lado, tenemos a la técnica inlay que nos menciona que se deberá poner el injerto entre dos pedículos de hueso esponjoso lo cual permitirá que este se absorba con mayor rapidez ⁽⁶⁸⁾. Sin embargo, a pesar de las diversas técnicas y tipos de injertos se ha demostrado que no se puede predecir totalmente el éxito de los mismos ya que siempre existe una recidiva significativa en cada uno de ellos por ende el seguir investigando y creando andamios impresos en 3D con porosidad graduada nos ayuda en replicar con exactitud el tamaño del defecto óseo favoreciendo la regeneración de este por medio de osteoconducción sin recidiva existente.

4. Hipótesis

Los andamios impresos en 3D con porosidad heterogénea, favorece la regeneración ósea en un modelo preclínico.

5. Objetivos

5.1 Objetivos generales

Evaluar la regeneración ósea por medio de andamios con porosidad heterogénea impresos en 3D.

5.2 Objetivos específicos

- Comprobar los parámetros de impresión en andamios 3D con porosidad heterogénea.
- Evaluación estructural del andamio (estructura superficial, porosidad y tamaño de poro).
- Determinar de manera descriptiva la zona del defecto por medio de imágenes de microtomografía.
- Calcular las unidades Hounsfield del tejido mineralizado en la zona del defecto.
- Estimar el porcentaje de regeneración del área de tejido *Novo*.

6. Material y Método

Recursos materiales

- Filamento de PLA
- Software Ultimaker Cura
- Impresora Monoprice Select
- Computadora
- Balanza analítica
- Vaso de precipitado
- Agua desionizada
- Microscopio electrónico de barrido
- Software Image J
- Gasas
- Guantes
- Bata quirúrgica desechable

- Gorro quirúrgico desechable
- Lentes protectores
- Equipo quirúrgico
- Campos estériles
- Aserrín
- Ratas estirpe *Wistar*
- Trefina de 9 mm
- Medicamentos (antibiótico, analgésicos y anestésico)
- Equipo de microtomográfico (uCT)

Método

Impresión 3D

La impresora 3D que se usó (Monoprice Select - Mini impresora 3D) se fundamenta en la técnica de modelado por deposición fundida (FDM) con extrusión capa por capa, la punta de extrusión tuvo un diámetro de 200 micras, elevando la temperatura a 205°C para fundir el filamento del ácido poliláctico (PLA) de color blanco, de 1Kg con 1.75 mm de diámetro, que se solidificó conforme entra en contacto con el ambiente y la cama de impresión con calibración manual. Para la estandarización de parámetros de impresión se utilizó el software Ultimaker Cura©.

Se realizó la impresión de 15 andamios de PLA con un diámetro de 9mm, tomándonos 5 horas en total.

a) Evaluación de la superficie del andamio (tamaño de poro)

Se obtuvo imágenes de los andamios en un equipo de microscopía electrónica de barrido (SEM) JEOL 5600 LV con un voltaje de operación de 25kV, con un aumento de 25x, utilizando electrones secundarios y retro-dispersados; las muestras fueron preparadas previo a su observación con un recubrimiento de película de oro mediante la pulverización catódica asistida por plasma para favorecer la conductividad. El equipo se encuentra en el Laboratorio Central de Microscopía del IFUNAM.

b) Porosidad del andamio

La porosidad se obtuvo utilizando el principio de Arquímedes en 100 ml de agua desionizada, la porosidad fue calculada de acuerdo con la siguiente fórmula). Se medirá la porosidad por triplicado.

$$\text{Porosity} = (\text{Wsat} - \text{Wdry}) / (\text{Wsat} - \text{Wsus}) \times 100 \%$$

Wsat= andamio saturado de agua

Wdry= andamio seco

Wsus= andamio suspendido en agua.

c) Procedimiento quirúrgico general en ratas *Wistar*

Los procedimientos quirúrgicos siguieron la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO1999, los protocolos de bioseguridad de COVID-19 y por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) aprobado con número FO-M001-0006-2021.

La metodología se siguió de acuerdo a lo estandarizado por Lucia P. et al.

Se utilizó una n=5 ratas *Wistar*. El grupo de especímenes se tranquilizaron y sedaron por vía intramuscular con Xilacina (10mg/kg) y por inhalación con Isoflurano al 5% utilizando el equipo Low-Flow Anesthetic Vaporizer con un flujo de inducción de 200ml/min y una concentración de 1-2.5%. La zona quirúrgica se rasuró y se realizó antisepsia de rutina con yodopovidona, se aplicó de manera tópica mepivacaína con epinefrina, a continuación, se realizó una incisión lineal de 3 cm a través de la piel y el periostio de la calota hasta exponer el vértice craneal. Para la realización del defecto crítico se utilizó una trefina con diámetro de 9 mm, montado en un motor para implantes a 4,000 rpm, se delimitó el defecto de tamaño estandarizado en la porción media del hueso frontal, irrigando con una solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS). Posteriormente con un cincel se realizó el clivaje del fragmento

óseo con sumo cuidado de no dañar la duramadre, lavando con PBS estéril la zona quirúrgica.

Los andamios impresos 3D de PLA con porosidad heterogénea se colocaron en el sitio del defecto. Finalmente, se afrontó el tejido suturando con ácido poliglicólico, en la figura 5 se observa el procedimiento descrito anteriormente.

Posterior a la cirugía se realizó un seguimiento clínico, observando es estado del animal, aspecto de la herida, si presentaba sangrado o exudado.

Las ratas permanecieron en condiciones de bioterio con un periodo de luz oscuridad de 12 horas, humedad al 50% y se alimentaron con rodent diet 5001 ad libitum.

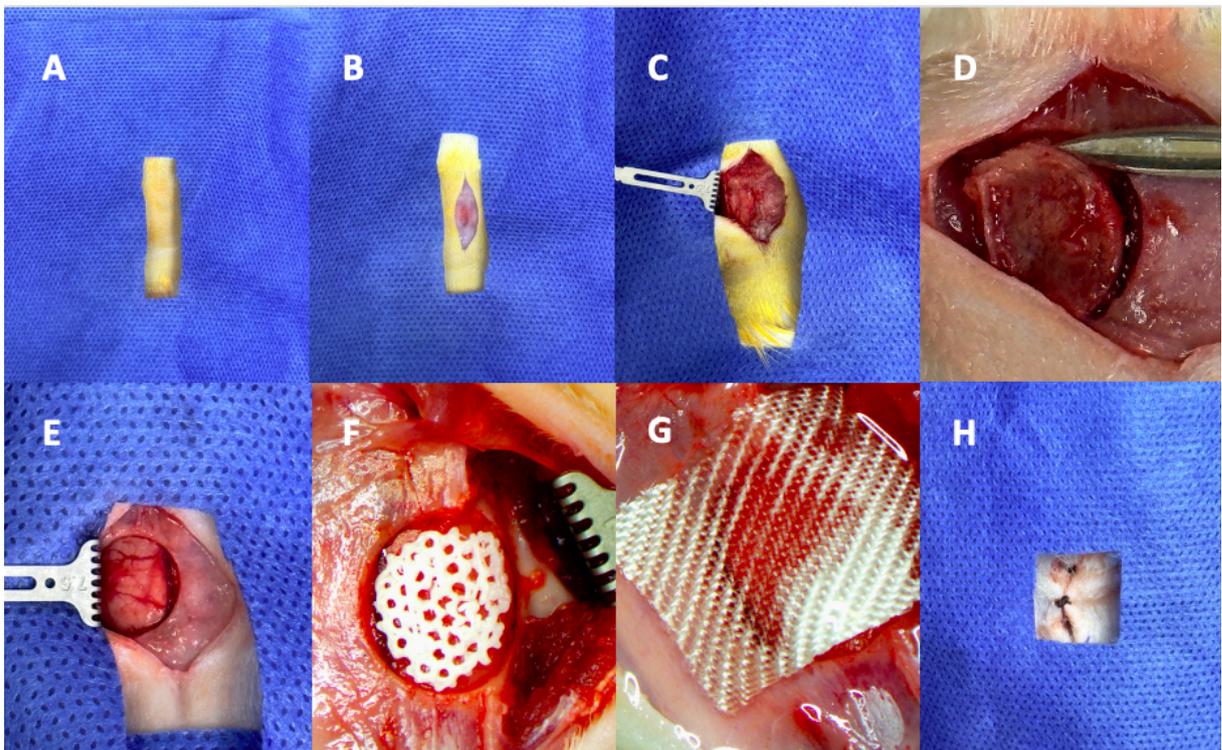


Figura 5. Procedimiento quirúrgico del defecto de tamaño crítico en calvaria de rata Wistar. A) Se desinfectó la zona del defecto, B) Se realiza una incisión, C) Se debrida hasta llegar al hueso, D) Se realiza el defecto con la trefina, E) Retiro de la porción de hueso, F) Se coloca el andamio para posteriormente colocar satin hemostático absorbible y G) Se sutura con 2 puntos simples.

d) Evaluación de los constructos implantados por microtomografía computarizada (μ CT) y microarquitectura.

Para evaluar las unidades Hounsfield del tejido *novo* y su microarquitectura, se adquirieron imágenes de μ CT de los animales a diferentes periodos de tiempo posterior a la implantación del constructo 3D de PLA a 8, 30, 60 y 90 días. El campo de visión se ubicó en la zona de la calvaria con una magnitud de corriente de 0.4 miliamperes (mA), un voltaje de 35 kilovoltios (kV) y 1000 proyecciones para obtener imágenes de alta resolución. Para calcular las unidades Hounsfield, se realizaron en las imágenes microtomográficas, círculos de 3 mm por lado en la zona del defecto, así como en zonas de hueso nativo (control), lo anterior por medio del software. Las imágenes en 3D de las muestras fueron procesadas por medio del Software OsiriX MD.

6.1 Clasificación del Tipo de Estudio

El tipo de estudio fue experimental, prospectivo, longitudinal.

6.2 Universo de Estudio

5 ratas macho cepa *Wistar* de 250 g del bioterio de la Fes Iztacala de la UNAM.

15 andamios de PLA de 9mm de diámetro, de los cuales 5 andamios fueron para la evaluación de la microarquitectura, 5 andamios fueron para la porosidad y 5 para la evaluación *in vivo*.

6.3 Muestra

CRITERIOS DE SELECCIÓN

- Criterios de Inclusión.

Andamios de PLA cada uno impreso bajo las mismas condiciones. Ratas macho sanas, cepa *Wistar* de 250 g.

- Criterios de Exclusión.

Se consideró a toda aquella muestra que no tenga el tamaño requerido. Ratas que no cumplan con el peso y/o estén enfermas.

-Criterios de Eliminación.

Andamios dañados por causas de impresión. Ratas que desarrollen alguna patología que no esté involucrada en el estudio.

6.4 Variables

Independientes

Variable independiente	Definición operacional	Escala de medición
Porosidad heterogénea de los andamios	Fórmula de porosidad con el principio de Arquímedes	Variable cuantitativa de razón
Tamaño de poro	Se midió con el Software Image J	Variable cuantitativa de razón

Dependientes

Variable dependiente	Definición operacional	Escala de medición
Unidades de atenuación (unidades Hounsfield)	Se midió con base en imágenes microtomográficas y el software OsiriX	Variable cuantitativa de razón
Microarquitectura	Se midió con base a microtomografías y el software Image J	Variable cuantitativa de razón

6.5 Diseño Estadístico

Se llevó a cabo una estadística descriptiva antes de seleccionar el análisis estadístico se realizaron pruebas de normalidad de los resultados para la correcta elección del tipo de estudio (paramétrica y no paramétrica). Los resultados fueron paramétricos; por lo tanto, el análisis estadístico que se realizó

fue un ANOVA de dos vías, con prueba Post Hoc Tukey, con una $p \leq 0.05$ de significancia para la evaluación de las unidades de atenuación, mientras que se realizó una prueba T-student con una $p=0.05$, para la comparación de los tamaños de poros impresos con los diseñados.

7. Resultado

7.1 Diseño del andamio 3D con porosidad heterogénea.

El diseño del andamio fue previamente realizado por el grupo de investigación del laboratorio de bioingeniería de tejidos DEPEL, tomando como modelo una imagen microtomográfica de un defecto de tamaño crítico en calvaria de rata *Wistar*, a partir de esta imagen se diseñó el andamio al tamaño exacto al defecto respetando la anatomía del mismo, utilizando los software InVesalius, Autodesk Meshmixer como se observa en la figura 6, donde se aprecia la adaptación exacta del andamio al defecto óseo tanto en una vista frontal (6A), lateral (6B) e interna (6C).

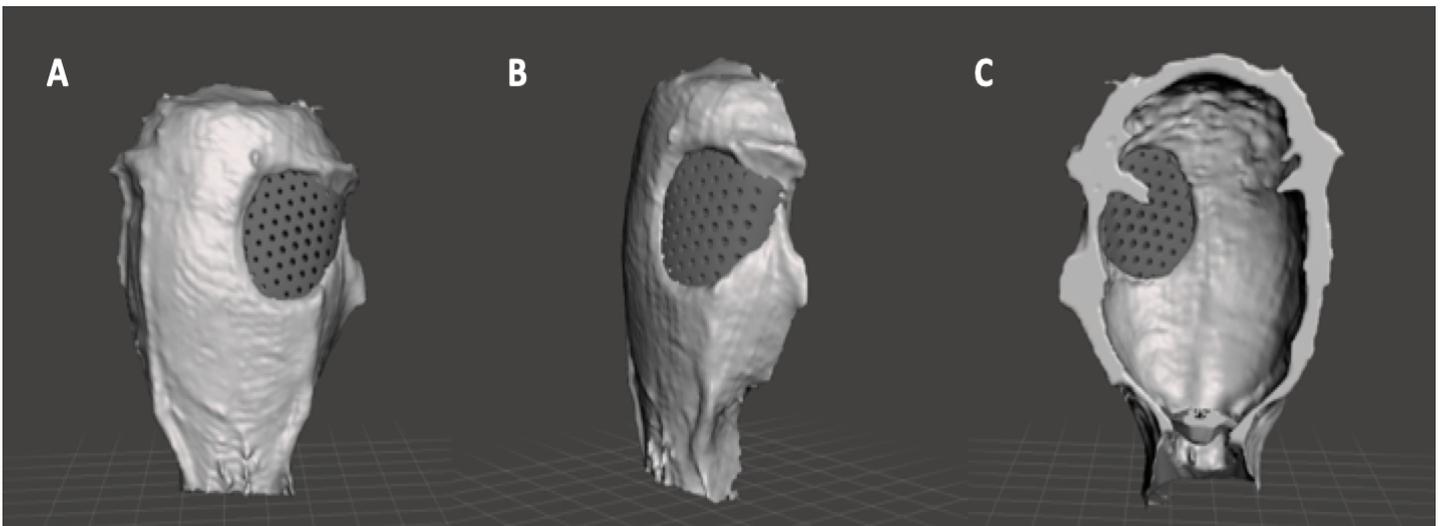


Figura 6. Adaptación del andamio al defecto óseo en el software Autodesk Meshmixer. A) Vista frontal, B) vista lateral y C) vista interna.

7.2 Impresión del andamio 3D con porosidad heterogénea.

Se imprimieron los andamios 3D utilizando la impresora 3D (Monoprice Select - Mini impresora 3D) la cual se fundamenta en la técnica de modelado por deposición fundida (FDM) con extrusión capa por capa (como se observa en la figura 7A), la punta de extrusión tuvo un diámetro de 200 micras, elevando la temperatura a 205°C para fundir el filamento del ácido poliláctico (PLA), de 1Kg con 1.75 mm de diámetro, que se solidificó conforme entro en contacto con el ambiente y la cama de impresión con calibración manual. En la figura 7B se observa el andamio impreso con material de adhesión. Todo el procedimiento tomó alrededor de 40 min por andamio.

Para la estandarización de parámetros de impresión se utilizó el software Ultimaker Cura© que fueron utilizados previamente en otra línea de investigación, a continuación, se observa en la tabla 1 los parámetros principales de impresión.

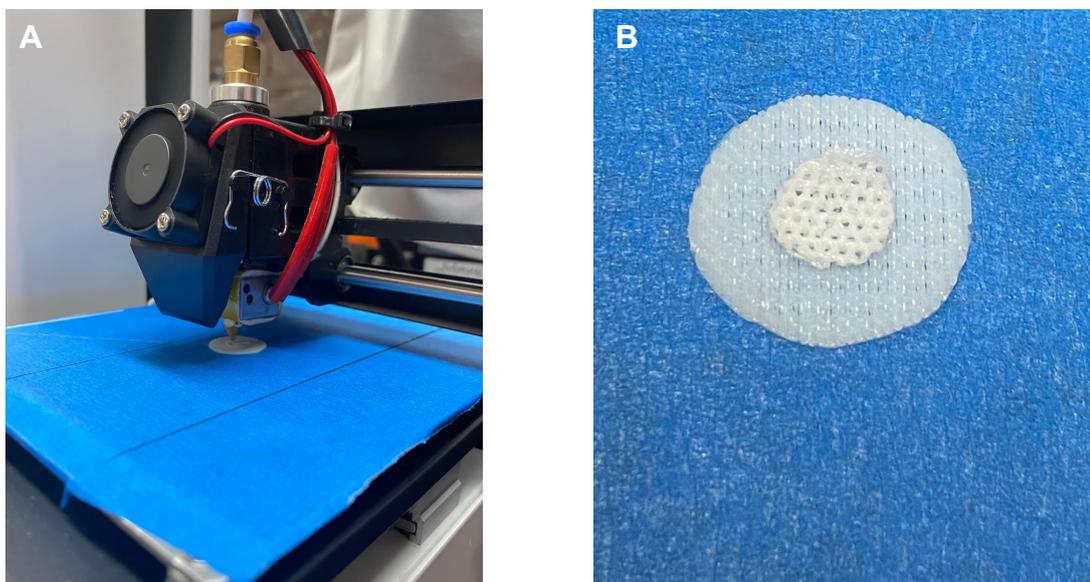


Figura 7. A) Impresión de andamios con impresora Monoprice Select - Mini impresora 3D con técnica de deposición fundida capa por capa. B) Andamio impreso finalizado con material de soporte.

PARÁMETROS DE IMPRESIÓN	
CALIDAD	
Altura de la capa	0.18mm
Grosor del borde	1.05mm
Habilitar retracción	Yes
RELLENO	
Grosor de la capa superior e inferior	0.72mm
Densidad de relleno	20%
VELOCIDAD DE TEMPERATURA	
Velocidad de impresión	10 mm/s
Temperatura de impresión	205C
SOPORTE	
Tipo de soporte	Everywhere
Plataforma de adhesión	Balsa
FILAMENTO	
Diámetro del filamento	1.75mm
Diámetro de la punta de extrusión	0.2mm

Tabla 1. Parámetros de impresión con el software Ultimaker Cura.

Una vez impresos los andamios podemos apreciar el tamaño del andamio de PLA, el cuál mide 9mm de diámetro (Figura 8A), se observa la cantidad de poros heterogéneos por el cual está conformado, así como la solidificación del mismo. Contiene alrededor de 50 poros heterogéneos distribuidos a manera que los de mayor calibre se encuentran al centro y conforme nos vamos acercando a la periferia del andamio el tamaño de estos va reduciendo, dándonos 3 tipos de poros perfectamente organizados en el andamio.

Es importante mencionar que, el andamio no está diseñado para contar con una superficie plana, siendo que, al abarcar los huesos temporal y parietal de la rata, cuenta con una cara cóncava para el ajuste exacto al defecto óseo y proporcionar así un mejor sellado periférico. En la imagen 8B se observa la cara cóncava del andamio donde se hace evidente la distribución de poros, en la imagen 8C corresponde a la cara interna del andamio y se observa que se mantiene la superficie porosa sin modificarse al eliminar el material de soporte. Se hace énfasis en la eliminación del material de soporte ya que esta viene perfectamente pegado al andamio y al momento del retiro se puede modificar el tamaño de poro, especialmente de la zona central.

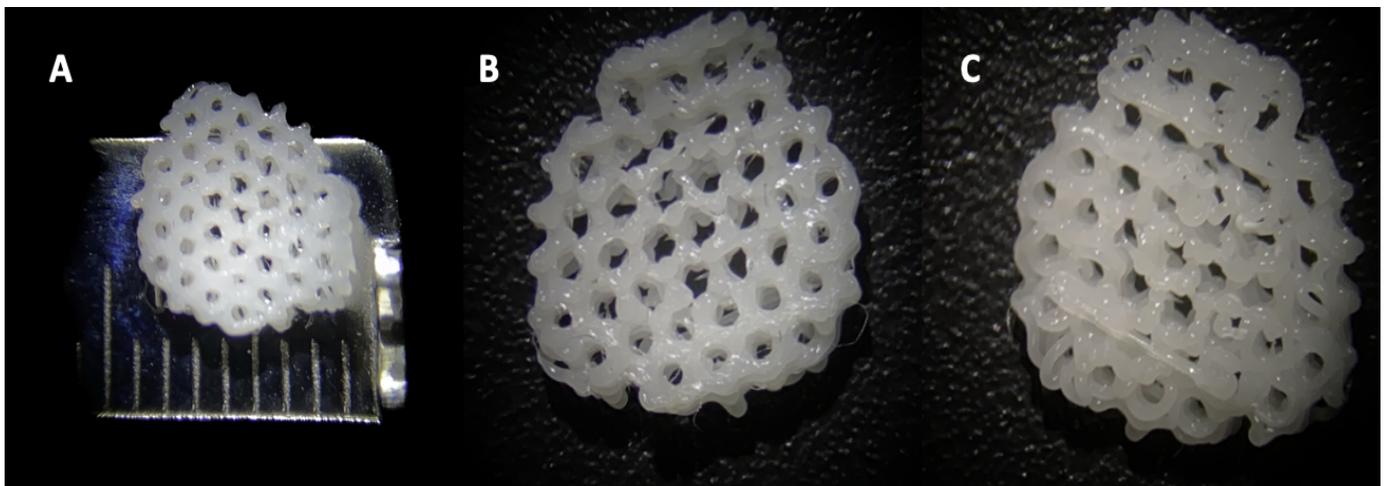


Figura 8. A) Andamio de PLA con 9mm de diámetro. B) Cara cóncava del andamio donde se hace evidente la distribución de poros. C) Andamio sin modificaciones por retiro de material de soporte.

7.3 Evaluación de la estructura del andamio.

En la siguiente figura (figura 9) podemos apreciar el centro del andamio con poros perfectamente definidos (figura 9A), sin material sobrante o bien, poros totalmente obstruidos, se puede observar cómo está conformado el andamio por múltiples poros sin espacios considerablemente grandes, así mismo se aprecia un mayor diámetro en los poros centrales en comparación con los que están en los bordes (figura 9B). En la figura 9C podemos observar los poros de la periferia igualmente con una gran definición mientras que en la figura 9C los poros conservan su diseño en los bordes de dicho andamio sin material sobrante o perdiendo la forma del defecto óseo sin modificar su tamaño.

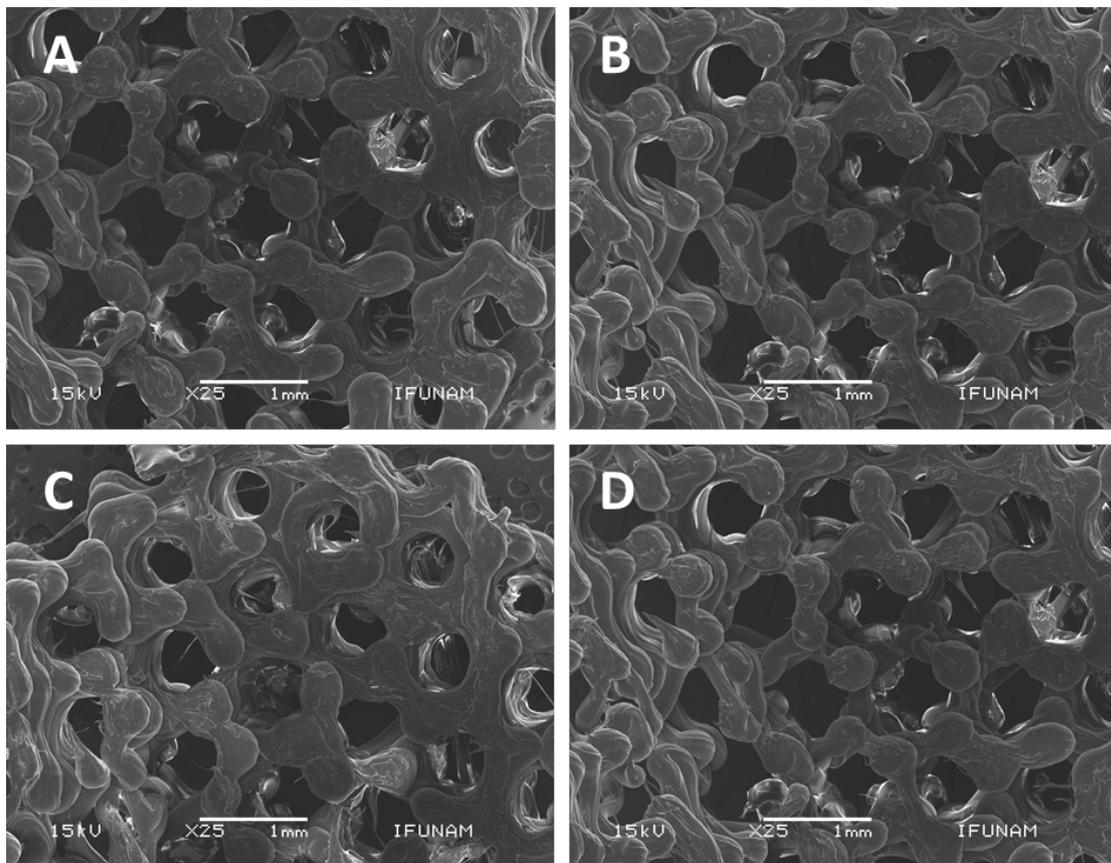


Figura 9. A) Centro de andamio con poros definidos. B y C) Se observa múltiples poros de diferente. D) Se observa poros de mayo tamaño.

Sin embargo, al momento de la impresión en 3D por deposición fundida se observó un ligero incremento en el diámetro de los poros, por lo que fue necesario realizar una comparación estadística entre los tamaños de poros impresos vs los diseñados, se realizó una T-student (figura 10), donde se comprobó que no hay diferencias estadísticas entre los tamaños de poros, lo que nos permite verificar que la técnica de impresión puede controlar el tamaño y forma de los mismos.

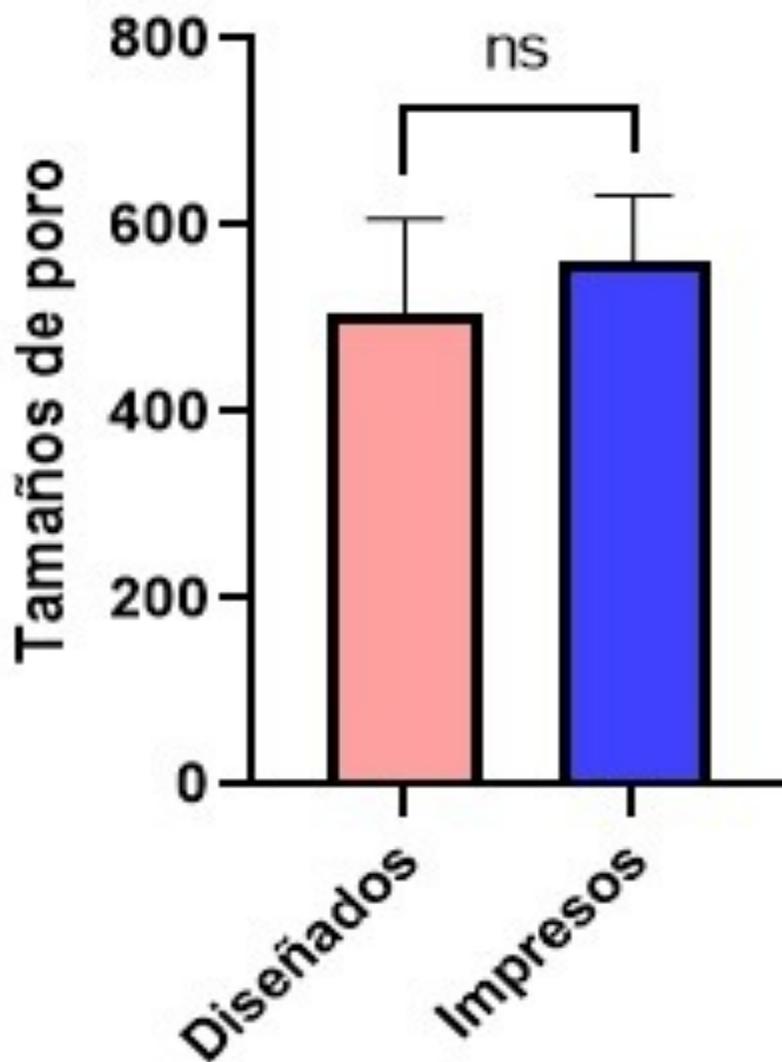


Figura 10. Comparación de tamaños de poro previamente diseñados vs impresos 3D en el andamio.

Tamaño de poros

En la figura 11 se observa la frecuencia de los tamaños de poros dentro del andamio, en el rango de 200 a 800 micras, teniendo con mayor frecuencia los poros de 502.03 micras, esta distribución corresponde a los tamaños de poros planeados desde la metodología donde los poros más grandes se encuentran en el centro, y el área de superficie es menor; se presentan con menor frecuencia como lo muestra el histograma, por otro lado, los poros de mayor frecuencia se

encuentra en los rangos de 200-500 micras, debido a que en los bordes cuentan con una mayor superficie, por lo tanto hay mayor frecuencia de estos tamaños de poros.

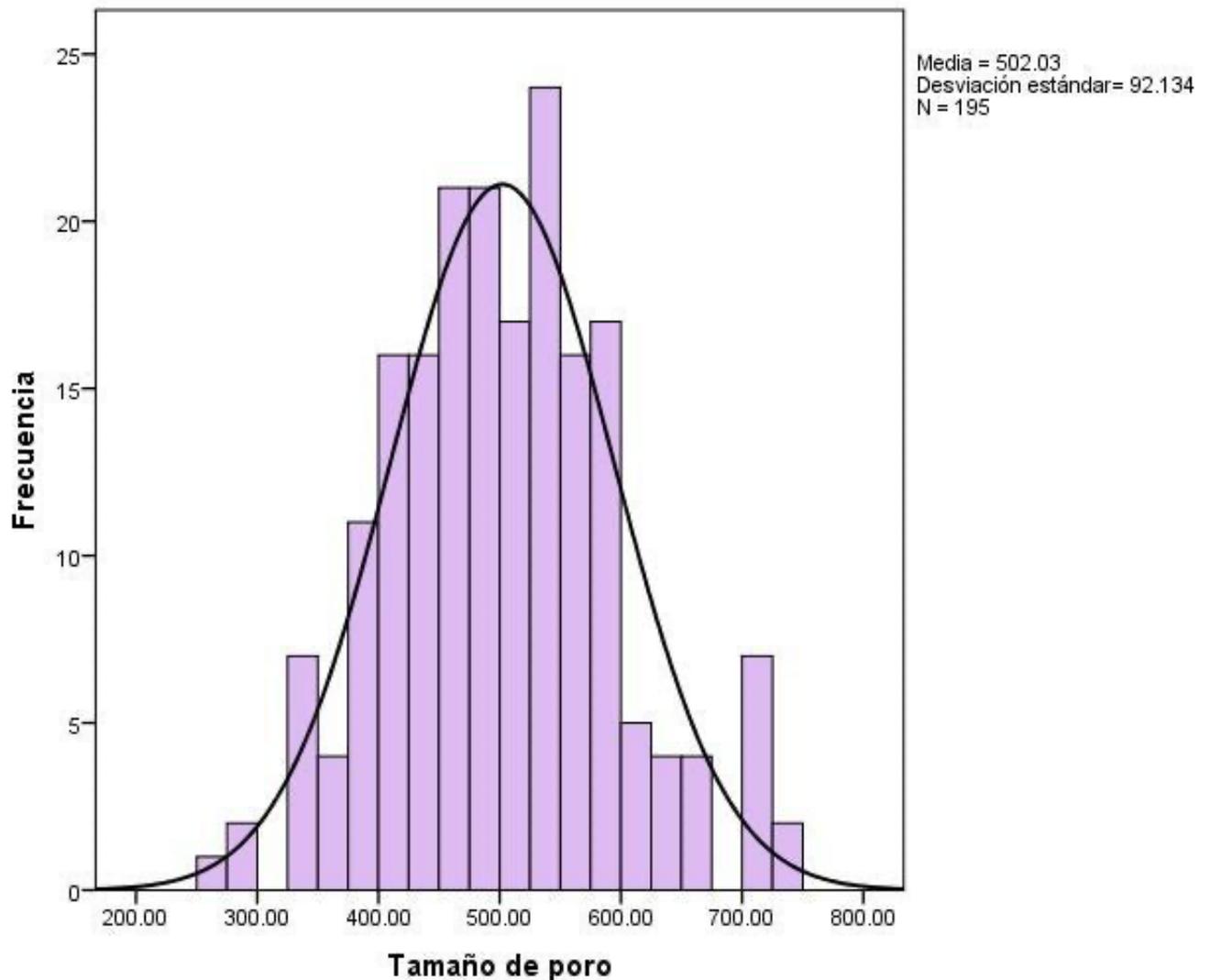


Figura 11. Histograma de distribución de poros en los andamios.

En el diagrama que se presenta a continuación (figura 12) podemos apreciar cómo fueron diseñados y distribuidos en toda la superficie del andamio los diferentes tamaños de poro, de la periferia al centro. En dicho diseño se puede apreciar los diversos tamaños de poro siendo en total 50 poros heterogéneos, de los cuales el centro está conformado por los poros de mayor tamaño, estando en un rango dentro de las 740 a 400 micras, en la periferia más cercana al centro

se encuentran los poros de 400 a 350 micras y en la periferia más externa tenemos poros de 300 a 240 micras.

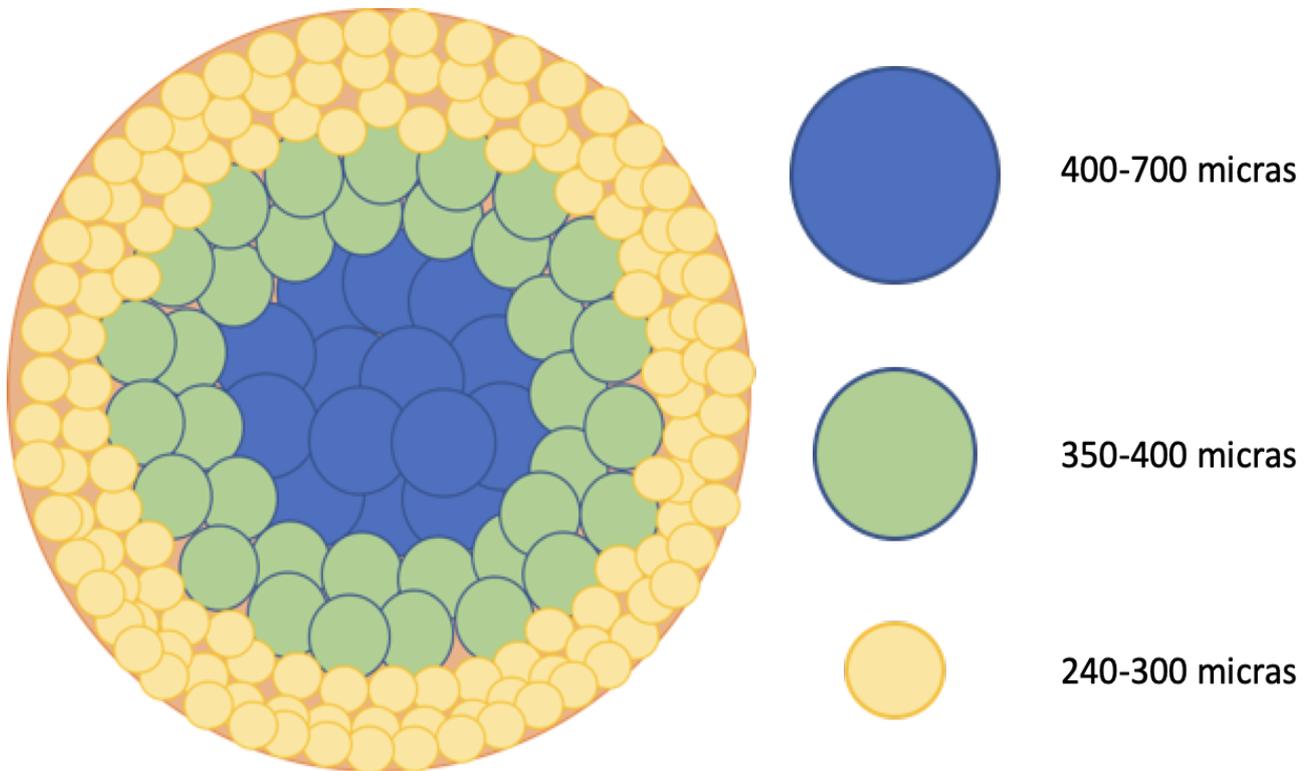


Figura 12. Histograma de distribución de los diversos poros a través del andamio, modificado de ⁽³⁴⁾.

Evaluación de la porosidad

Se evaluó la porosidad de cada andamio, se tomaron 5 muestras, las cuales se pesaron en seco dándonos un resultado de:

M1 27.7 mg

M2 27.6 mg

M3 28.8 mg

Los andamios suspendidos en agua dieron un resultado de:

M1 27.5 mg

M2 26.9 mg

M3 28.4 mg

Los resultados de los andamios saturados de agua son los siguientes:

M1 52.0 mg

M2 60.3 mg

M3 50.0 mg

Finalmente la porosidad promedio fue de 98%.

7.4 Integración del andamio al tejido.

En la figura 13 se observa el cráneo de la rata *Wistar* en el día 8 donde aún no es visible la formación de tejido *novo* (figura 13A-B).

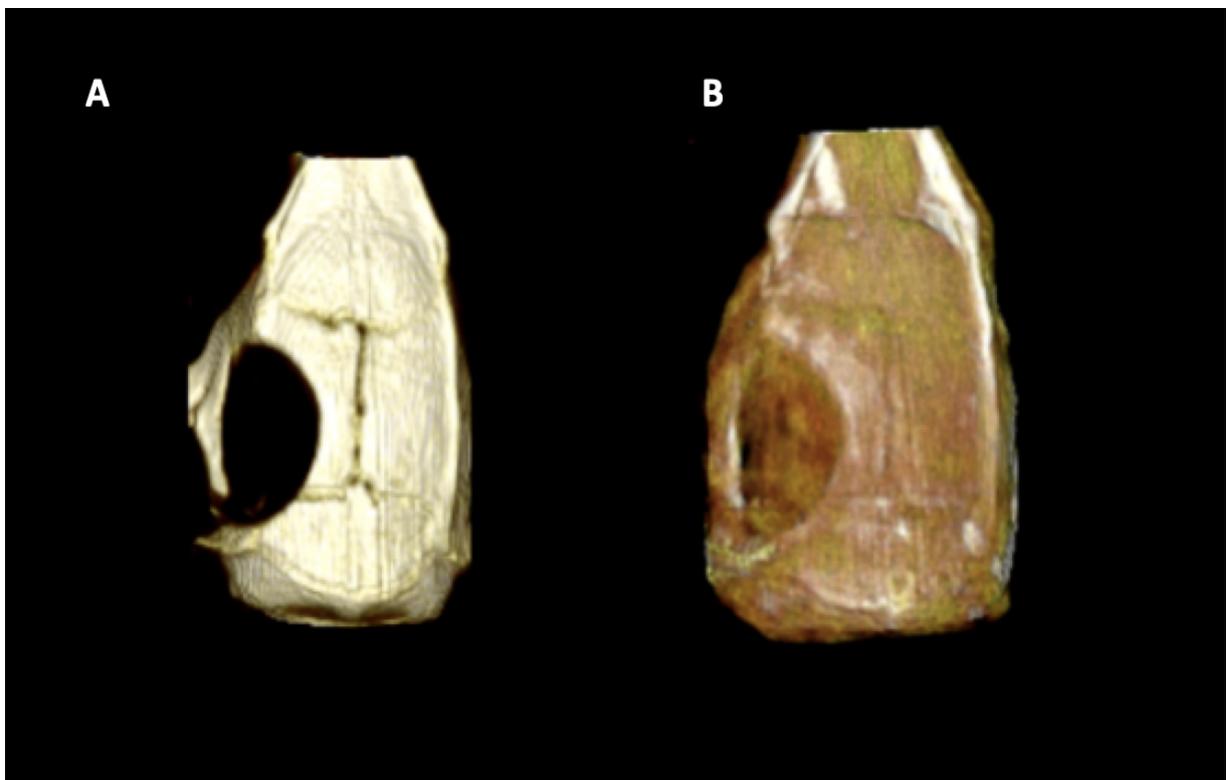


Figura 13. A) Cráneo de rata *Wistar*, se observa la zona del defecto el cual no presenta tejido *novo*. B) Calvaria de rata donde se observa la zona del defecto, así como tejido hipodenso correspondiente a tejido blando.

En la figura 14 podemos apreciar un notorio incremento, en relación con el día 8, de tejido *novo* siendo en el día 30 visible (figura 14A) la cantidad de tejido *novo* que va desde la parte periférica del defecto óseo hasta la parte más central del mismo, teniendo una anatomía semejante a un racimo de uvas delgado bien conformado, en la figura 14B se aprecia con mayor claridad cómo en el día 60 se muestra con mayor densidad y tamaño la cantidad de tejido *novo* formado,

empezando a distribuirse en mayor parte al centro del defecto e iniciando una ligera ramificación hacia la periferia del defecto en diferentes direcciones, en la figura 14C siendo el día 90 de nuestro proyecto, podemos ver con mayor claridad la densidad que ha podido generarse a partir del tejido *novo* ya formado en el día 60, conservando aún la anatomía de racimo de uvas pero con un notorio incremento de volumen y siguiendo las líneas de ramificación hacia la periferia del andamio llegando a acercarse al otro extremo del defecto óseo.

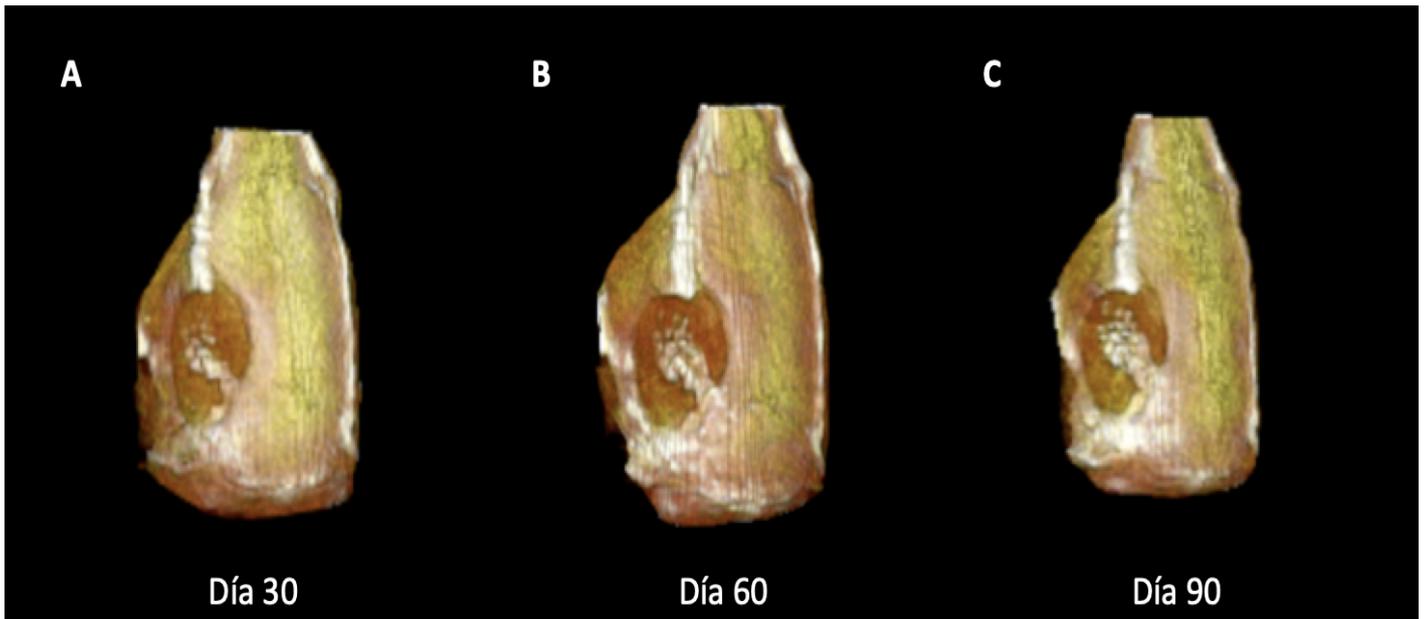


Figura 14. A) Día 30 con una pequeña cantidad de tejido *novo* formado con una anatomía de pequeño racimo de uvas delgado conectado desde la periferia del defecto óseo hasta el centro del mismo, B) En el día 60 se aprecia mayor densidad y tamaño de tejido *novo* formado empezando a distribuirse del centro a la periferia, C) Día 90 mayor tamaño del área de tejido *novo*, conservando anatomía de racimo de uvas, pero con incremento de volumen y siguiendo las líneas hacia la periferia.

7.5 Medición de tejido *novo* en unidades Hounsfield

A continuación, la figura 15 compara unidades Hounsfield del tejido *novo*, andamio y el hueso nativo.

En el eje X se observan los diferentes tiempos en que se llevó a cabo la evaluación, constando del día 30, 60 y 90. En el día 30 se aprecia que el hueso nativo no tuvo ninguna variabilidad, la cantidad de tejido del andamio se mantuvo igual, sin embargo en la cantidad de tejido neoformado presentó una diferencia significativa igualándose a la del andamio, en el día 60 el hueso nativo no tuvo ningún cambio respecto al día 30, las unidades Hounsfield de tejido neoformado para este día 60 se nota un incremento con respecto al día 30, para nuestra

última etapa siendo el día 90 podemos ver como el tejido nativo se mantiene intacto con respecto a los días anteriores, en la cantidad de material del andamio podemos observar, al igual que en el día 60 que existió una disminución en su radiodensidad siendo cada vez menor aunque no representando mayor significancia, por otro lado en el tejido neoformado se aprecia igualmente un incremento respecto al día 60, siendo así constante el crecimiento de dicho tejido óseo conforme el paso de los días, por lo cual se considera se ha llevado a cabo con éxito la osteoconducción de nuestro andamio hacia el defecto óseo de tamaño crítico.

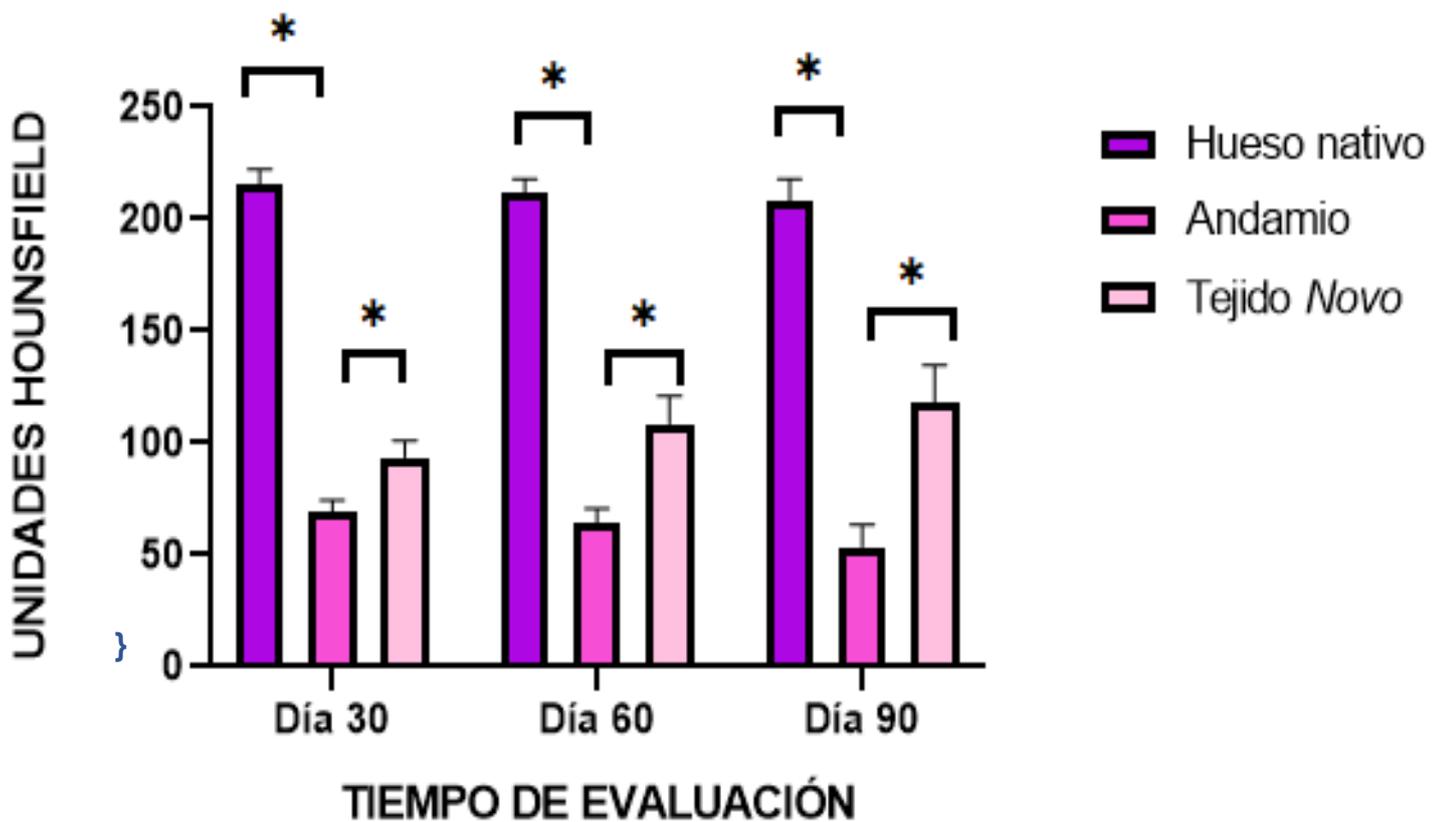


Figura 15. Evaluación de unidades Hounsfield en tres tipos de tejido: hueso nativo, andamio y tejido *novo*.

7.6 Estimación del porcentaje de regeneración ósea del tejido neoformado

En la figura 16A se puede apreciar que a los 8 días el área total del defecto fue de 9 mm con 126.17 mm², el cual se tomó como 100% del área, en la figura 16B en el día 30 presentó un área de 16 mm² y su porcentaje de tejido *novo* fue del 12.76%, en la figura 16C (60 días), presentó un área de 26 mm² y su porcentaje de tejido *novo* fue del 21%, para finalizar en el día 90 se puede observar (figura 16D) un área de 30 mm² con un porcentaje de 24 del área total.

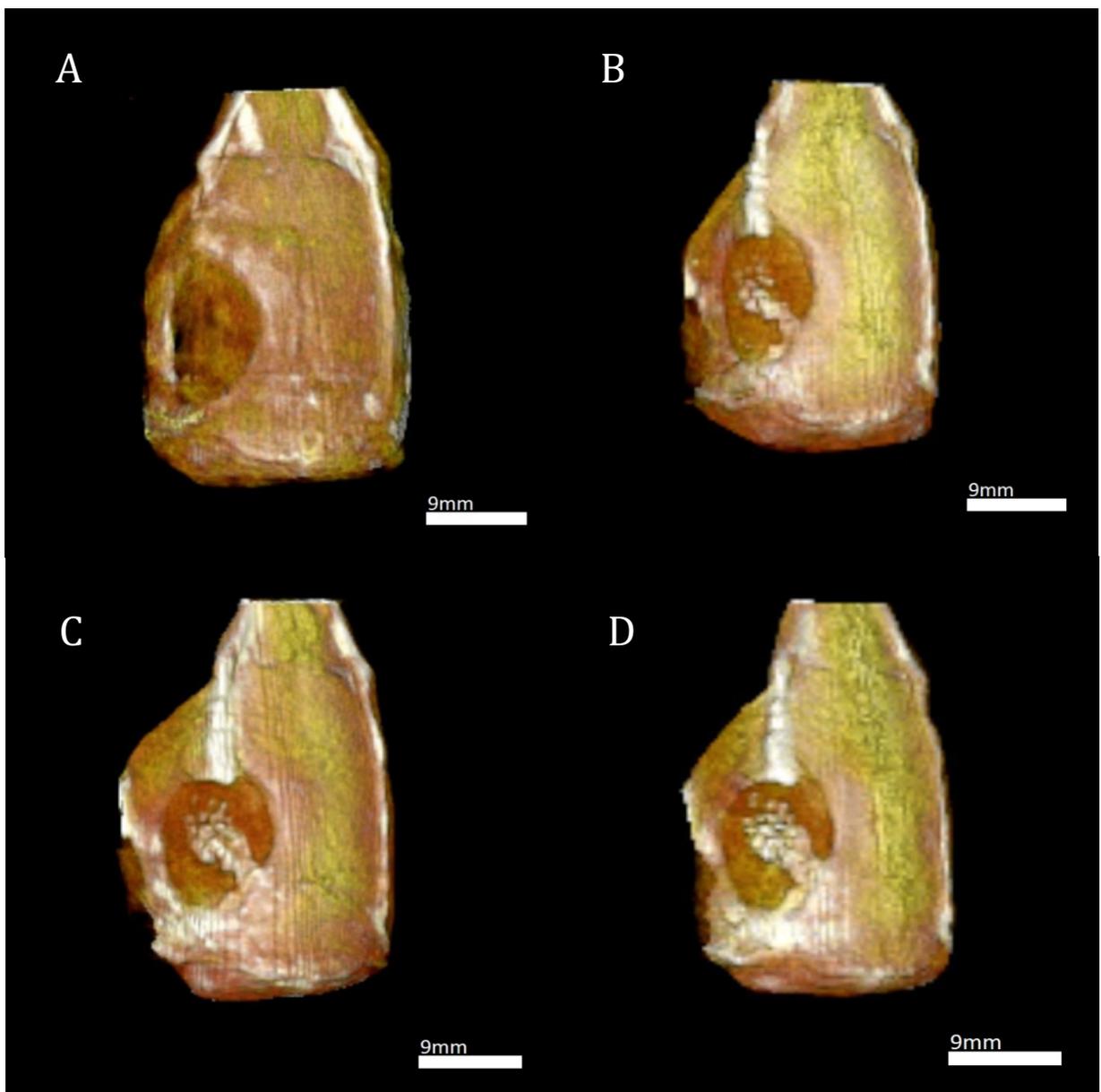


Figura 16. Tomografía de defecto óseo. A) Área del 100% a los 8 días, B) Tejido *novo* formado en un área del 12.76%, C) Tejido *novo* formado en área del 21% y D) Tejido *novo* formado en área del 24%.

8. Discusión

En la bioingeniería de tejidos ha sido fundamental la implementación del uso de nuevos materiales así como de nuevas técnicas que nos permitan seguir avanzando hacia el futuro para mejorar la calidad de vida de los pacientes, una de estas técnicas y la que hasta el momento ha llamado más la atención es la impresión 3D ya que ha sido una herramienta sumamente útil no solo para el área odontológica sino para toda la rama de la salud, dando así oportunidad de implementarla en diversas planificaciones de cirugías para hacer de estas una opción más segura para los pacientes.

En la impresión 3D la técnica modelado por deposición fundida (FDM) consiste en ir depositando material capa por capa con el fin de fabricar objetos complejos en su diseño, por ejemplo modelos anatómicos completos o solo porciones de ello, aditamentos para cirugías y fabricación de andamios para la regeneración ósea como lo fue en este caso. Se hizo la elección de esta técnica debido a su disponibilidad en el uso de diversos softwares, y por presentar un costo asequible para el paciente.

Es por ello que nos hemos enfocado en el uso de biopolímeros para este proyecto, donde se diseñó un andamio de 9mm de diámetro pensando especialmente para defectos de tamaño crítico en una zona maxilofacial, el diseño fue creado con poros de mayor calibre en el centro del defecto ya que es la zona más difícil de llevar nutrientes por la baja vascularización que posee, en la periferia se distribuyeron poros de menor calibre ya que es más cercana al tejido nativo y mejora la cantidad de nutrientes. Cristian y col. en su estudio demostró que a poros de mayor calibre existe un crecimiento óseo lineal, mientras que en poros de menor calibre el crecimiento óseo resulta no mineralizarse por completo, sin embargo en la investigación de Chung y col. ⁽⁶⁹⁾ nos menciona que aún no se ha dado un tamaño de poro óptimo para la mejor y mayor regeneración ósea tanto en su forma como en su mineralización.

En este proyecto, se decidió utilizar el biopolímero de PLA porque es producido a partir del ácido láctico, un producto natural, obtenido por fermentación de fuentes renovables. Dicho material ha sido utilizado con anterioridad por su gran cualidad de ser biodegradable, biocompatible, bioreabsorbible y se ha utilizado

para implantes ortopédicos, como placas o tornillos para el tratamiento de fracturas; Granados y col. mencionan el uso de PLA como una alternativa óptima para la fabricación de andamios ya que por sus propiedades anteriormente mencionadas de dicho material puede llegar a imitar las condiciones de la matriz extracelular (MEC), también es más accesible para su manufactura y es un factor importante a la hora de elegirlo.

Se implantó los andamios de PLA en un modelo óseo *in vivo* utilizando ratas macho de la cepa *Wistar*, haciendo un defecto de tamaño crítico en la calvaria de las ratas en la zona de los huesos temporal y parietal, dándonos una zona compleja para adosar el andamio, sin embargo, se logró obtener de manera precisa la forma de dicha zona consiguiendo un sellado periférico favorable.

Posteriormente, se evaluó el proceso de regeneración de los defectos óseos durante 4 etapas constando del día 8, 30, 60 y 90 para valorar de manera óptima el desarrollo del tejido *novo* en cada una de estas etapas.

Después del término de la evaluación por imágenes microtomográficas, se observaron resultados favorables ya que existió de manera contundente la formación de tejido mineralizado en los días 30, 60 y 90, siendo esta última etapa la que se mostró de manera más visible la cantidad del mismo.

Por esta razón la obtención de andamios impresos en 3D con porosidad heterogénea puede utilizarse en el área clínica para una mejor osteoconducción en defectos de tamaño crítico, logrando reducir el tiempo quirúrgico y riesgos en las cirugías.

Pil y col. Mencionan el uso de modelos impresos en 3D de manera exitosa donde hubo una reducción de tiempos de cirugía de hasta 5 horas para los casos de reducción de colgajo en cirugías de reconstrucción maxilomandibular.

Por otro lado, Hans y col. reportaron la utilización de andamios diseñados e impresos en 3D, con materiales biocompatibles y biodegradables para la reconstrucción de defectos maxilares en pacientes que previamente habían recibido cirugías oncológicas, sin embargo, no lograron la formación de tejido óseo. No obstante, en este proyecto de investigación el andamio impreso en 3D con porosidad heterogénea ha dado resultados favorables para la osteoconducción en defectos de tamaño crítico en calvarias de rata *Wistar*.

Por esta razón, podemos decir que en este trabajo se formó con éxito tejido mineralizado, dando así un paso importante hacia el futuro, donde se pueda utilizar este tipo de andamios en pacientes y obtener recuperaciones menos traumáticas e invasivas.

9. Conclusión

A pesar de las limitaciones de la técnica elegida podemos decir satisfactoriamente que se ha logrado el objetivo de dicho proyecto, no olvidando que esta técnica a pesar de no ser la más exacta fue elegida por lo amigable que es tanto para el operador como en cuestión de costo-beneficio para el paciente. Pudiendo así imprimir los andamios con los diferentes tamaños de poros, para su perfecto sellado en el defecto óseo, obteniendo resultados prometedores ya que se demostró que existe osteoconducción en los mismo, promoviendo su aplicación futura en el área de bioingeniería de tejidos, para más adelante poder llegar a toda el área médica beneficiando a un mayor número de pacientes.

10. Aspectos Éticos y Legales

El proyecto fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Odontología (CICUAL-FO) de la UNAM, el cuál fue aceptado con el número CIE/10/01/2015.

11. Referencias

1. Fernandez-Tresguerres I, Bases Fisiologicas de la Regeneración Ósea II. Proceso de Remodelado, Vol II, No 2,mar/abr 2006.
2. Navarro D. Craniofacial bone defects characterization with tridimensional reconstruction software and CAD/CAM technology, Ciencia e Innovación en Salud, 3838, 21/01/21,12.
3. Solis L. Prevention of osseous defaults in the craneosinostosis surgery using calvarian cranial particulate bone, 2, 2010/04/21, 118-124.
4. Rosales Ibáñez R, Alvarado Estrada KN, Ojeda Gutiérrez F. Ingeniería Tisular Odontología. Rev Adm. 2012;VOL. LXIX(4):164-7
5. Estrada C. Paz A. Ingeniería de tejido óseo: Consideraciones básicas. ReEIA. 2006;5:93-100
6. Ochoa S, Aguilar N, Méndez A. Investigación y Ciencia. Ing tejidos Una nueva Discip en Med Regen. 2012,64,61-9.
7. Sabino MA, Loaiza M, Dernowsek J, Rodrigo R. EN INGENIERÍA DE TEJIDOS TECHNIQUES FOR MANUFACTURING POLYMER SCAFFOLDS WITH POTENTIAL APPLICATIONS IN TISSUE ENGINEERING Artículo Invitado (ASAP). Rev Lat Met MAAt. 2017,37, 2.
8. Navarro D, Meléndez G, López C. Caracterización de defectos óseos craneofaciales con software de reconstrucción tridimensional y tecnología CAD/CAM. Ciencia e Innovación en Salud. 2021.
9. Serrano C, Ruiz J, Quiceno L, Rodríguez M. Labio Y/O Paladar Hendido: Una Revisión. UstaSalud. 2009, 8(1): 44–52.
10. Alfwaress S, Khwaileh A, Rawashdeh A, Alomari A, Nazzal S. Cleft Lip and Palate: Demographic Patterns and the Associated Communication Disorders. J Craniofac Surg2017
11. Voigt A, Radlanski RJ, Sarioglu N, Schmidt G. Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten./[Cleft lip and palate]. Pathologe. 2017; 38(4): 241–247.
12. Kruger. Ecuador; 2018 [actualizado 8 Jun 2018].
13. Smarius B, Loozen C, Manten W, Bekker M, Pistorius L, Breugem C. Accurate diagnosis of prenatal cleft lip/palate by understanding the embryology. World J Methodol. 2017.

14. Portero C. Clase esquelética e inclinación dental en pacientes con labio y paladar hendido, Rev Eug Esp vol.14 no.1 Riobamba ene./jun. 2020
15. Batista González NM, Llanes Rodríguez M, de Armas Gallegos LI, Navarro Díaz L. Modificaciones cefalométricas esqueléticas en pacientes Clase II División 1 tratados con Aparato Bimler. Rev haban cienc med. 2017; 16(2): 177-88.
16. Ispe Garbin AJ, Wakayama B, Saliba TA, Saliba Garbin CA. Intervención precoz de la mordida cruzada por vía directa de Planas: informe de siete años de seguimiento. Rev Cienc Salud. 2020; 18(2): 119-28.
17. Delgado Velázquez R, Imbert Fuentes Y, Legrá Silot EB, Calavia Infante ME, Zamora Rodríguez MN. Mediciones de índice de Mayoral y diámetro transversal de maxilares, comparación en estudiantes de secundaria. Rdo. inf. Científico 2017; 96(5):875-82
18. Herrero Solano Y. Relación entre hábitos orales deformantes y micrognatismo transversal. MULTIMED. 2018; 22(4).
19. Lima Torres M, Corrales González SC, Torres Bioti AM, Mazón Hernández E, Rodríguez Martínez M. Tratamiento con Activador Elástico Abierto de Klammt en pacientes con Síndrome de Clase III. Rev. Ciencias Médicas. 2020; 24(1): 130-40.
20. Mora Y. Tratamiento del micrognatismo transversal con activador abierto elástico de Klammt, Multimed vol.25 no.5 Granma sept.-oct. 2021
21. Prognatismo mandibular o clase III, Instituto Maxilofacial Barcelona
22. Cohen MM Jr, Rollnick BR, Kaye CI. Espectro oculoauriculovertebral: una crítica actualizada. paladar hendido J 1989; 26(4): 276-286.
23. Mielnik-Blaszczak M. Microsomía hemifacial. Revisión de la literatura. Dent Med Probl 2011; 40(1): 80-85.
24. Heike CL, Luquetti DV, Hing AV. Descripción general de la microsomía craneofacial. En: editores Pagon RA, Adam MP, Bird TD. GeneReviews® [Internet] · Seattle: Universidad de Washington, Seattle; 1993-2013.
25. Hartsfield JK. Revisión de la heterogeneidad etiológica del espectro oculo-auriculo-vertebral (Microsomía Hemifacial). Orthod Craneofac Res 2007; 10(3): 121-128.
26. Poswillo D. La patogenia del síndrome del primer y segundo arco branquial. Cirugía Oral Oral Med Oral Pathol 1973; 35(3): 302-328.

27. Johnston MC, Bronsky PT. Modelos animales para malformaciones craneofaciales humanas. *J Craneofac Genet Dev Biol* 1991; 11(4): 277-291
28. Maruko E, Hayes C, Evans CA, Padwa B, Mulliken JB. Hipodoncia en microsomía hemifacial. paladar hendido *Craneofac J* 2001; 38(1): 15-19.
29. 8. Sulik KK, Cook CS, Webster WS. Teratógenos y malformaciones craneofaciales: relaciones con la muerte celular. *Development* 1988;103 :213-231.
30. Wiszniak S, Mackenzie FE, Anderson P, Kabbara S, Ruhrberg C, Schwarz Q. El VEGF derivado de células de la cresta neural promueve la extensión de la mandíbula embrionaria. *Proc Natl Acad Sci US A.* 2015; 112(19): 6086-6091.
31. Werler MM, Sheehan JE, Hayes C, Mitchell AA, Mulliken JB. Exposiciones vasoactivas, eventos vasculares y microsomía hemifacial. *Defectos de nacimiento Res A Clin Mol Teratol* 2004; 70(6): 389-395.
32. Werler MM, Sheehan JE, Hayes C, Padwa BL, Mitchell AA, Mulliken JB. Factores demográficos y reproductivos asociados a la microsomía hemifacial. paladar hendido *Craneofac J* 2004; 41(5): 494-450.
33. Wiczorek D, Ludwig M, Boehringer S, Jongbloet PH, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B. Anomalías en la reproducción y embarazos gemelares en padres de pacientes esporádicos con espectro oculo-aurículo-vertebral/síndrome de Goldenhar. *Hum Genet* 2007; 121(3-4): 369-376.
34. Ewart-Toland A, Yankowitz J, Winder A, Imagire R, Cox VA, Aylsworth AS et al. Anomalías oculoauriculovertebrales en hijos de madres diabéticas. *Soy J Med Genet*; 2000 90(4): 303-309
35. Wang R, Martinez-Frias ML, Graham JM Jr. Los bebés de madres diabéticas tienen un mayor riesgo de sufrir la secuencia oculoaurículo-vertebral: un enfoque basado en casos y controles de casos. *J Pediatr* 2002; 141(5): 611-617.
36. Werler MM, Starr JR, Cloonan YK, Speltz ML. Microsomía hemifacial: desde la gestación hasta la infancia. *J Craneofac Surg* 2009; 20: 664-669.
37. Tasse C, Majewski F, Bohringer S, Fischer S, Ludecke HJ, Gillessen-Kaesbach G et al. Una familia con espectro oculo-aurículo-vertebral autosómico dominante. *Clin Dysmorphol* 2007; 16(1): 1-7.

38. Kelberman D, Tyson J, Chandler DC, McInerney AM, Slee J, Albert D et al. Microsomía hemifacial: progreso en la comprensión de la base genética de un síndrome malformativo complejo. *Hum Genet* 2001; 109(6): 638-645.
39. Brady AF, Winter RM, Wilson LC, Tatnall FM, Sheridan RJ, Garrett C. Microsomía hemifacial, atresia del canal auditivo externo, sordera y anomalías mullerianas asociadas con acroosteolisis: ¿un nuevo síndrome autosómico recesivo? *Clin Dysmorphol* 2002; 11(3): 155-161
40. Choong YF, Watts P, Little E, Beck L. Goldenhar y los síndromes de criducat: ¿un síndrome de delección de genes contiguos? *JAAPOS* 2003; 7(3): 226-227.
41. Derbent M, Yilmaz Z, Baltaci V, Saygili A, Varan B, Tokel K. Chromosome 22q11.2 delección y características fenotípicas en 30 pacientes con defectos cardíacos conotruncuales. *Am J Med Genet A* 2003; 116A(2): 129-135.
42. Asociación AC-PC. Parámetros para la Evaluación y tratamiento de pacientes con labio hendido/paladar hendido u otras anomalías craneofaciales. Edición revisada 2009. Publicación original *Paladar hendido-Craniofacial Journal* 1993; 30.
43. Ohtani J, Hoffman WY, Vargervik K, Oberoi S. Manejo del equipo y resultados del tratamiento para pacientes con microsomía hemifacial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012; 141:S74-81.
44. Vargervik K, Oberoi S, Hoffman WY. Equipo de atención al paciente con fisura: protocolos y resultados de la UCSF. *J Craneofac Surg* 2009; 20 :1668-1671.
45. Veliz S. Microsomia hemifacial una revision en la literatura, *Rev Fac Odontol Univ Antioq* vol.27 no.2 Medellín Ene./Julio 2016
46. 1. Governale LS. Craniosynostosis. *Pediatr Neurol* 2015;53:394-401.
47. 2. Zuleta F. A. Craneosinostosis: Visión del neurocirujano. *Rev Chil Pediatría* 2002;73:506-7.
48. 4. Abd-El-Barr MM. Molecular Genetics and Principles of Craniosynostosis. En Youmans and Winn ed. *Neurol. Surg.* 7th ed., Elsevier; n.d., p. 1550-1551.

- 49.5. Sergesketter AR, Elsamadicy AA, Lubkin DT, Krucoff KB, Krucoff MO, Muh CR. Characterization of Perinatal Risk Factors and Complications Associated with Nonsyndromic Craniosynostosis. *J Craniofac Surg* 2018;34-8.
50. Fernandez J. Craneosintosis, una perspectiva pediátrica, *Rev. chil. pediatr.* vol.91 no.6 Santiago dic. 2020 Epub 08-Oct-2020.
51. Suhonen L, Hiilesmaa V, Kaaja R, Teramo K. Detection of pregnancies with high risk of fetal macrosomia among women with gestational diabetes mellitus. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008;87(9):940-5.
52. Van Gelder MMHJ, Reefhuis J, Caton AR, Werler MM, Druschel CM, Roeleveld N, et al. Maternal Periconceptional Illicit Drug abuse and the Risk of Congenital Malformations. *Epidemiology.* 2009;20(1):60-6.
53. Broussard CS, Rasmussen SA, Reefhuis J, Friedman JM, Jann MW, Riehle-Colarusso T, et al. Maternal treatment with opioid analgesics and risk for birth defects. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;204(4):314e1-11.
54. Peterson-Falzone SJ. Types of clefts and multianomaly craniofacial conditions. *Semin Speech Lang.* 2011;32(2):93-114.
55. Butali A, Mossey PA, Adeyemo WL, Jezewski PA, Onwuamah CK, Ogunlewe MO et al. NigeriaCRAN Collaboration. Genetic studies in the Nigerian population implicate an MSX1 mutation in complex oral facial clefting disorders. *Cleft Palate Craniofac J.* 2011;48(6):646-53.
56. Ludwig KU, Mangold E, Herms S, Nowak S, Reutter H, Paul A, et al. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nat Genet.* 2012;44(9):968-71.
57. Sabbagh HJ, Hassan MH, Innes NP, Elkodary HM, Little J, Mossey PA. Passive smoking in the etiology of non-syndromic orofacial clefts: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015;11;10(3):e0116963.
58. Molgaard-Nielsen D, Hviid A. Maternal use of antibiotics and the risk of orofacial clefts: a nationwide cohort study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2012;21(3):246-53.

59. Trindade-Suedam I. Diabetes mellitus and drug abuse during pregnancy and the risk for orofacial clefts and related abnormalities, *Rev. Latino-Am. Enfermagem* 24 • 2016
60. Li J, Du H, Li P, Zhang J, Tian W, Tang W. Ameloblastic carcinoma: An analysis of 12 cases with a review of the literature. *Oncol Lett.* 2014;8(2):914-20.
61. Khoozestani NK, Mosavat F, Shirkhoda M, Azar R. Ameloblastic carcinoma with calcification: A rare case report in the mandible and literature review. *Case Rep Dent.* 2020;2020:1-6.
62. Deng L, Wang R, Yang M, Li W, Zou L. Ameloblastic carcinoma: Clinicopathological analysis of 18 cases and a systematic review. *Head Neck.* 2019;41(12):4191-8.
63.
Caubet Biayna J. Manejo de defectos óseos anteroposteriores en el frente estético, *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*, vol.31 no.2 Madrid mar./abr. 2009
64. Nicolás Meszaros E. Biomateriales y tecnologías de impresión 3D en entrenamiento quirúrgico en otorrinolaringología: una revisión, *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* vol.83 no.1 Santiago mar. 2023
65.
Zuluaga F. ALGUNAS APLICACIONES DEL ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO *Rev. acad. colomb. cienc. exact. fis. nat.* vol.37 no.142 Bogotá Jan./Mar. 2013.
66. Escalona N, Use of 3D printing techniques in mandibular reconstruction. A brief review, *CES odontol.* vol.34 no.2 Medellín July/Dec. 2021.
67. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
68. Tortolini P. y Rubio S. Diferentes alternativas de rellenos óseos, *Avances en Periodoncia* vol.24 no.3 Madrid dic. 2012.
69. Chung S, King MW. Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 2011;58(6):423–38.
70. Tesis de la CD. Nataly Mariana Carbajal Casique.

