



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

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

**DISEÑO DE CONSTRUCTOS EN 3D POR MEDIO DE IMÁGENES
MICROTOMOGRÁFICAS PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Lucía Pérez Sánchez

TUTORA

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

Ciudad de México

abril 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto DGAPA-UNAM PAPIIT/A205818

ÍNDICE

Resumen	2
Abstract	4
Introducción	6
I.-Marco teórico.....	7
1.1 Hueso.....	7
1.2 Defectos en la cavidad oral	12
1.3 Regeneración ósea	13
1.4 Tratamientos	14
1.5 Defectos de tamaño critico en animales	21
II.- Antecedentes.....	22
2.- Ingeniería de tejidos.....	22
2.1 Andamios o constructos para la regeneración ósea	23
2.2 Técnicas de fabricación 3D	24
3.- Células troncales	30
3.1 Células troncales mesenquimales (MSC)	30
3.2 Usos en la regeneración ósea	33
3.3 Células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental (DPSC).....	37
3.4 DPSC y regeneración ósea	39
4.- Biopolímeros.....	40
4.1 Poliacido láctico.....	40
III- Justificación	42
IV.- Planteamiento del problema	42
V.-Hipótesis	43
VI- Objetivos	44
VI.- Metodología y diseño	45
VIII.- Resultados	50
IX.- Discusión.....	61
X.-Conclusiones.....	66
XI.- Referencias	67

Resumen

La ingeniería de tejidos ha surgido como una estrategia para reemplazar tejido óseo perdido o dañado, a través de sustitutos biológicos que permitan la recuperación completa de la función. Diversos factores etiológicos están involucrados en la pérdida ósea como la enfermedad periodontal, atrofia del hueso relacionada a diferentes síndromes, lesiones traumáticas, reabsorción ósea asociada a tumores benignos o malignos, entre otras. Las cuales se han tratado de resolver por diferentes métodos basados en injertos (autoinjertos, xenoinjertos y aloplásticos), los cuales sirven como matriz de soporte, de relleno y/o estabilizadores; sin embargo, carecen de una estructura procesable tanto en forma como en su porosidad, aunado a que el volumen del tejido regenerado es insuficiente debido a las fuerzas mecánicas (xenoinjertos y aloplásticos). Por otro lado, estas estrategias metodológicas, son incapaces de generar estructuras que se conformen y adapten con mayor precisión al tipo de defecto óseo, siendo un reto significativo en las regiones craneofaciales por su tamaño.

En comparación con las anteriores estrategias metodológicas, la tecnología de impresión tridimensional (3D) ha surgido como un proceso que puede controlar con precisión la arquitectura del constructo a escala micro- y nanométrica a través del tamaño del poro, la interconectividad entre ellos, así como la geometría exacta al defecto donde será implantado.

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue diseñar y sintetizar constructos individualizados por impresión 3D a partir de imágenes microtomográficas para la regeneración de defectos de tamaño crítico en calvaria de rata *Wistar*, utilizando la técnica de impresión de modelado por deposición fundida (FDM), por la cual se imprimió un andamio que se adaptó de manera exacta a los bordes de los defectos óseos en la calvaria y se logró obtener una superficie del andamio con una porosidad homogénea, gracias al entrecruzamiento de las fibras de ácido poliláctico (PLA) adicionando capa por capa. Además, se llevó a cabo una evaluación del proceso de regeneración a 8, 30, 60 y 90 días por medio de μ CT, en donde se analizó que al final del periodo de evaluación se integró en los bordes del tejido óseo y que el tejido que se formó está en proceso de mineralización de acuerdo a los resultados de la densidad mineral ósea (DMO), ya que conforme van pasando los días el tejido va aumentando la cantidad de miligramos de hidroxiapatita por centímetros cúbicos (mgHA/cc).

Por otro lado, se utilizaron células troncales derivadas de pulpa dental DPSC, debido a su capacidad de diferenciarse a células de linaje óseo, los resultados demuestran que la DMO del tejido que se está formando entre los andamios (sin células y con células) no presentaron diferencias significativas, probablemente a que la geometría y arquitectura fueron exactas al defecto óseo y con la porosidad anteriormente mencionada, lo cual permitió ser reconocido por las células huésped así como las células DPSC permitiendo formar un tejido *novo* similar al tejido nativo, siendo una estrategia importante en el área de la ingeniería de tejidos óseos.

Abstract

Tissue engineering, has emerged as a strategy to replace lost or damaged bone tissue, through biological substitutes that allow complete recovery of function. Various etiological factors are involved in the loss of periodontal disease, bone atrophy, related to the different syndromes, traumatic injuries, resorption, association of benign or malignant tumors, among others. Changes in the media are included in autografts, xenografts and alloplastic. However, there is not yet a volume in which it can't be used due to mechanical forces (xenografts and alloplastics). On the other hand, these methodological strategies are incapable of generating structures that adjust and adapt with greater precision in the type of bone defect, being a significant challenge in the craniofacial regions due to their size.

The comparison between methodological strategies, three-dimensional (3D) printing technology has emerged as a process that can precisely control the architecture of the micro and nanometric scale construction through the pore size, the interconnectivity between them, as well as the exact geometry to the defect where it will be implanted.

The main objective of this research was to design and synthesize the individualized constructs by 3D printing from microtomographic images for the regeneration of the quality of the Wistar rat calvaria, using the printing technique of deposition of funds. (FDM) A scaffold was printed that exactly matches the edges of the bony defects in the calvaria and a scaffold surface with a homogeneous porosity is obtained, thanks to the crosslinking of the polylactic acid (PLA) fibers. In addition, we will see an evaluation of the regeneration process at 8, 30, 60 and 90 days in the middle of the μ CT where the end of the evaluation period of the integration of the edges of the bone tissue and the tissue that is formed will be observed. It is a tissue in the process of mineralization because an evaluation of the bone mineral density is performed and shows that it is fulfilled during the next few days. The tissue corresponds to the number of milligrams of hydroxyapatite in cubic (mgHA / cc).

On the other hand, stem cells derived from dental pulp DPSC are included due to their ability to differentiate into cells of bone lineage, where the mineral density is bone of the tissue that is being formed between the scaffolds, comparing the two experimental groups, the group experimental scaffold seeded with the DPSC cells showed greater BMD, compared to the scaffold group without the cells. Therefore, the use and scaffolding printed in 3D with

geometries and exact architectures in the bone defect and with the porosity are mentioned in this state as a suitable surface to adhere and colonize the scaffold in the mineralization process, I feel an important strategy in the area of bone tissue engineering.

Introducción

La ingeniería de tejidos óseos es un campo multidisciplinario donde interviene no solo el área de la ingeniería, sino también el campo biológico y de la salud, teniendo como principales objetivos el reparar, mantener y mejorar el tejido óseo.

Conforme ha ido avanzado la tecnología, la ingeniería de tejidos óseos ha tenido que mejorar las técnicas de fabricación de andamios, el uso de biomateriales y en últimas fechas la aplicación de células troncales mesenquimales, debido a su capacidad regenerativa. Por lo que en este proyecto se utilizó la técnica de fabricación de andamios 3D, por técnica de deposición fundida (FDM), la cual en comparación con otras técnicas de fabricación de andamios, permitió controlar una de las características principales de los andamios que es la porosidad, por otro lado, como biomaterial se utilizó el ácido poliláctico (PLA) debido a que es utilizado ampliamente en el área médica y aprobado por la FDA para su uso clínico, adicionalmente en estos andamios se sembraron células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental (DPSC), debido a su capacidad para diferenciarse a linaje óseo con ciertos estímulos.

Es importante mencionar, que actualmente los tratamientos para defectos óseos se basan en el uso de injertos, los cuales no se pueden adaptar de manera exacta al defecto óseo y no se puede predecir el tejido óseo que se está formando, por lo que en este proyecto la tecnología 3D adquirió un papel crucial, ya que a través de imágenes microtomográficas se logró diseñar andamios que se adaptaron de manera exacta en forma, bordes y geometría al defecto óseo, utilizando softwares específicos para el diseño, posteriormente se imprimió el andamio y se realizaron ensayos de viabilidad utilizando DPSC, posteriormente se hicieron estudios en modelo óseo *in vivo* utilizando ratas macho cepa *Wistar*, donde se categorizaron en tres grupos aleatoriamente, grupo control (solo el defecto óseo), grupo experimental (defecto óseo con andamio 3D sin células) y el grupo experimental celular (defecto óseo con andamio 3D con células DPSC), se continuó con la evaluación de las imágenes microtomográficas (μ CT), analizando las distintas radiodensidades y posteriormente se evaluó la densidad mineral ósea (DMO) de todos los grupos, en tres zonas de interés (hueso nativo, andamios, y tejido *novo*). Siendo el objetivo principal el tejido *novo* el cual tuvo una densidad mineral ósea similar al tejido nativo, permitiéndonos postular que es un tejido en proceso de mineralización.

I.-Marco teórico

1.1 Hueso

Composición y estructura

El tejido óseo es un tejido conectivo mineralizado, heterogéneo, jerárquico, formado por una matriz orgánica e inorgánica que está en constante cambio en donde interviene diferentes procesos bioquímicos y celulares, su principal función es conformar el sistema esquelético que protege, sostiene a los órganos del cuerpo humano y permite su movilidad. Además de almacenar calcio, fosfato y otros minerales, así como contener a la medula ósea⁽¹⁾.

Células del linaje óseo

Las células que forman parte del sistema óseo son los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Los osteoblastos son células derivadas de las células troncales mesenquimales (MSC) el compromiso de diferenciación a osteoprogenitor requiere la expresión de genes específicos a un tiempo determinado como proteínas morfogenéticas de hueso (BMP), miembros de la vía de señalización Wnt y para continuar a osteoblasto es necesario la expresión de genes como Runx 2, Dlx5 por sus siglas en inglés (Runx related transcription factors 2 y Distal-less homeobox 5 respectivamente), los encargados de empezar el proceso de mineralización, cuando estos se encuentran rodeados de matriz extracelular mineralizada se convierten en osteocitos los cuales se localizan en lagunas alrededor de la matriz extracelular ósea, los osteocitos provienen de la diferenciación de los osteoblastos y en este proceso se reconoce cuatro estados: osteocito-osteocito, preosteocito, osteocito inmaduro y osteocito maduro, son identificados morfológicamente por sus prolongaciones o canalículos los cuales se conectan entre osteocitos por medio de uniones Gap, así como a procesos citoplasmáticos de osteoblastos y células de revestimiento óseo en la superficie ósea facilitando el transporte intercelular de pequeñas moléculas de señalización tales como las prostaglandinas y el óxido nítrico, por lo que las células pueden enviar mensajes a través del tejido óseo. Es importante mencionar que en los últimos años se ha estudiado su funcionamiento como mecano-sensores de estrés, el cual traduce los estímulos mecánicos a procesos bioquímicos, bajo esta estimulación mecánica los osteocitos producen varios mensajeros secundarios como: Óxido nítrico (NO), ATP, Ca²⁺ y prostaglandinas, las cuales influyen en la fisiología ósea, además de orquestar

la remodelación ósea al estar en contacto con el osteoblasto para la formación de matriz extracelular mineralizada y al comunicarse con el osteoclasto para la reabsorción ósea⁽²⁾.

Finalmente el osteoclasto es una célula multinucleada que proviene de las células troncales hematopoyéticas, que necesita factores específicos para su diferenciación tales como, Factor Estimulante de Factores de Macrófagos (M-CSF) secretado por células mesenquimales osteoprogenitoras y osteoblastos así como el ligando RANK (RANKL) el cual es secretado por osteoblastos, osteocitos y células estromales, también tiene un papel crucial la Proteína Osteoprotegerina (OPG) la cual es producida por osteoblasto, células estromales, fibroblastos gingivales y periodontales estas tres proteínas son esenciales para la activación de los factores de transcripción y por lo tanto la expresión de genes involucrados en la diferenciación a osteoclastos y en el proceso de osteoclastogénesis, siendo las dos primeras proteínas relacionadas con la proliferación e inhibición de la apoptosis y la activación de la osteoclastogénesis, sin embargo, la proteína OPG inhibe dicho proceso al bloquear la interacción RANK/RANKL. Una característica importante de los osteoclastos es que tienen una morfología polarizada cuando están en remodelación ósea. Se pueden observar cuatro dominios de membrana: la zona de sellado y el borde ondulado que están en contacto con la matriz ósea, así como los dominios secretoriales basolaterales y funcionales que no están en contacto con la matriz ósea, el borde ondulado adquiere un papel importante en la actividad del osteoclasto ya que es una zona formada por el tráfico intenso de componentes endosomales y lisosomales, como la enzima H⁺ - ATPasa que ayuda a acidificar la laguna de resorción y por lo tanto, a diluir los cristales de hidroxapatita, otras enzimas importantes son la Fosfatasa Ácida Resistente a Tartrato (TRAP), la Catepsina K y la Metaloproteínasa-9 de matriz (MMP-9) se transportan a una pequeña concavidad llamada laguna Howship que conduce a la degradación ósea. Los osteoclastos endocitan los productos de degradación y descomponen de manera adicional en monosacáridos, disacáridos, aminoácidos y se transfieren al dominio secretor funcional en la membrana plasmática y de ahí a los capilares más cercanos^(3,4).

Matriz ósea

La matriz ósea posee constituyentes inorgánicos y orgánicos. La matriz orgánica ósea está compuesta principalmente por la proteína colágena (90%) y por proteínas no colágenas, como Osteocalcina, Osteonectina, Osteopontina, Fibronectina, Sialoproteína II, Proteína Morfogénica Ósea (BMPs) y factores de crecimiento; además de proteoglicanos ricos en leucina, incluyendo decorina, biglicano, lumican, osteoadherina y proteínas séricas; en

cuanto a la matriz inorgánica sus principales componentes son iones de calcio, fosfato y una cantidad considerable de bicarbonato, sodio, potasio, citrato, magnesio, carbonato, fluorita, zinc, bario y estroncio. La enucleación de calcio y fosfato forman cristales de hidroxiapatita con la fórmula $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$. La hidroxiapatita se deposita en un andamio con proteínas colágenas y no colágenas esta asociación es responsable de la dureza y resistencia del tejido óseo^(2,5).

La proteína colágena I además de dar resistencia y dureza al tejido óseo, también controla el tamaño y la orientación de los cristales de hidroxiapatita y promueve la unión celular, la proliferación y diferenciación, así mismo las proteínas como Sialoproteína Ósea (BSP) son enucleadoras de hidroxiapatitas y se encarga de unir la colágena con la hidroxiapatita, la osteopontina regula el crecimiento y el tamaño de los cristales de hidroxiapatita principalmente, la osteocalcina promueve la diferenciación de los precursores de los osteoclastos e induce su diferenciación⁽⁵⁾.

Mineralización de la matriz extracelular ósea.

La mineralización de la matriz extracelular está relacionada con la expresión de proteínas colágenas y no colágenas (osteocalcina, osteopontina y sialoproteína ósea), además de enzimas como fosfatasa alcalina. Como ya se mencionó estas proteínas ayudan a regular de manera ordenada la deposición de mineral por la cantidad y tamaño de los cristales de hidroxiapatita que se están formando⁽¹⁾.

El proceso de mineralización se da en dos etapas; vesicular y fibrilar en la primera los osteoblastos liberan vesículas que en el interior se incluyen iones calcio fosfato y otros iones metálicos, y las enzimas liberadas por los mismos osteoblastos rompen las vesículas y liberan los iones alrededor de la matriz extracelular orgánica la cual se le conoce como fase fibrilar, los componentes orgánicos enuclean los iones principalmente calcio y fosfato para crear cristales de hidroxiapatita. Las enzimas que se mencionan son las fosfoproteínas cinasas y la fosfatasa alcalina que pueden incrementar la concentración del fosfato y eliminar los inhibidores de la hidroxiapatita que contienen fosfatos con el propósito de modificar su acción como enucleadores^(1,6).

Otra molécula importante implicada en la mineralización es la vitamina D, esta vitamina después de ser absorbida es metabolizada por el hígado en 25-hidroxivitamina D y en el riñón se forma un producto activo 1,25-dihidroxivitamina D [$1,25-(OH)_2D$], responsable de mantener el calcio y fosfato en el suero en una adecuada concentración, debido a que

permite su absorción en el intestino delgado. Además, promueve la diferenciación de los osteoblastos al estimular la expresión de fosfatasa alcalina, osteocalcina, osteonectina, OPG y una variedad de citocinas⁽⁴⁾.

Tipos de hueso

La literatura refiere dos tipos de hueso: Trabecular y cortical, el primero de ellos consiste en una red laminar y estructuras poligonales llamadas trabéculas que están comunicados con la médula ósea, mientras que el hueso compacto es denso, sólido y rodea el espacio medular. Tanto el hueso cortical, como el trabecular está compuesto por osteonas, las osteonas corticales se denominan sistemas Haversianos, los cuales son de forma cilíndrica, cuyo eje mayor consiste en un eje vascular; las paredes de estos canales Haversianos están formados por láminas concéntricas y tienen aproximadamente 400mm de largo y 200mm de ancho en la base y forman una ramificación dentro del hueso cortical. Clarke *et.al* en el 2008, menciona que la porosidad del hueso cortical suele ser del 5%, pero esto depende de la remodelación activa de los sistemas Haversianos⁽¹⁾.

Las osteonas trabeculares son conocidas como “packets”, tienen forma semilunar con un grosor promedio de 50 a 400mm y está compuesta por láminas concéntricas^(1,8).

Diferencias de tipo de hueso a nivel microscopio

Según la literatura, existen dos tipos de deposición ósea, de acuerdo con su microarquitectura, cantidad y organización de sus componentes orgánicos vista por medio de un microscopio electrónico de barrido (SEM), los cuales son: reticular y laminar. El hueso reticular se caracteriza por una orientación irregular y desorganizada de las fibras de colágena, se le conoce como hueso primario, embrionario o inmaduro, debido a que es el primero en aparecer durante el desarrollo esquelético. Sin embargo, también se presenta en procesos de reparación ósea o como resultado de ciertas patologías como osteítis fibrosa quística, hiperparatiroidismo, enfermedad de Paget entre otras⁽⁷⁾.

El hueso laminar se caracteriza por fibras de colágena organizadas, dentro de estructuras laminares (lamelas), que comprimen las fibras de colágena, formando una orientación determinada, que le da una resistencia significativa. El hueso laminar se conoce como hueso secundario o maduro, debido a que reemplaza al hueso secundario o reticular, durante el remodelado óseo, siendo el patrón laminar el que más constituye a los huesos del esqueleto adulto, sean cortical o trabecular^(1,8,9).

Histogénesis del hueso

Existen dos tipos de osificación ósea: intramembranosa y endocondral. La esqueletogénesis empieza con la migración de las células mesenquimales derivadas del linaje embrionario a los sitios donde se formará el hueso, en estos sitios hay una alta densidad celular, donde las células mesenquimales pueden diferenciarse a condrocitos y formar moldes de cartílago o formar tejido óseo (formación endocondral) o diferenciarse directamente a osteocitos (formación intramembranosa)^(5,10).

La formación endocondral consiste en el reemplazo del cartílago por tejido mineralizado el cual es un proceso complejo que está regulado por los condrocitos en el centro del cartílago que pasan a un estado hipertrófico-no proliferativo, que es sustituido por osteoblastos progenitores, osteoclastos, células endoteliales en los vasos sanguíneos y células hematopoyéticas. Los osteoblastos provenientes del pericondrio que deposita el hueso cortical alrededor del cartílago, durante el desarrollo fetal, el centro de osificación primario se expande y los centros de osificación secundarios se forman en uno o ambos extremos del hueso en desarrollo. Esto resulta en el desarrollo del cartílago de la placa de crecimiento epifisario, responsable del crecimiento longitudinal de los huesos. Dentro de las placas de crecimiento, los condrocitos se organizan en zonas estructurales y funcionales, cada una con distintos patrones de expresión génica. Las células pequeñas y relativamente inactivas están ubicadas en la zona de reserva cerca del centro de osificación secundario, mientras que los condrocitos proliferantes están presentes en la zona proliferativa adyacente. Estas células experimentan expansión clonal y se alinean en columnas paralelas a la dirección del crecimiento longitudinal. Cuando las células entran en la zona hipertrófica, dejan de proliferar y pueden sufrir apoptosis. Los datos recientes sugieren que las células hipertróficas no están todas en apoptosis, pero también pueden convertirse en osteoblastos⁽¹⁾. Con la edad, las placas de crecimiento se adelgazan y eventualmente son reemplazadas por hueso en varios momentos después de la pubertad en los humanos. El hueso intramembranoso se forma directamente de la condensación de las células mesenquimales sin ningún cartílago de precursor⁽¹⁰⁻¹²⁾.

1.2 Defectos en la cavidad oral

En la cavidad oral, los defectos óseos más comunes se encuentran en el hueso periodontal son causados principalmente por enfermedad periodontal. Sin embargo, existen otros factores como trauma, cirugías o resección de tumores⁽¹³⁾.

La pérdida de hueso alveolar por enfermedad periodontal provoca diferentes tipos de defectos óseos, como son la pérdida de hueso en forma horizontal, la cual se caracteriza en que la cresta alveolar se encuentra en una posición apical y tiene un pronóstico desfavorable debido a que el injerto óseo que se coloque en ese sitio no recibirá suficiente irrigación vascular, teniendo como consecuencia la pérdida del tejido *novo*. Pérdida de hueso vertical, donde el defecto se encuentra contenido dentro de la cresta alveolar teniendo un pronóstico favorable para la regeneración ósea. Otros autores han clasificado los defectos óseos como cráter interdental, hemiseptum, márgenes inconsistentes, invasiones de furcación y defectos intraóseos⁽¹⁴⁾.

Por otro lado, los defectos intraóseos son los defectos en el hueso alveolar propiamente dicho, los cuales se clasifican de acuerdo con el número de paredes óseas. Cuando el defecto óseo está conformado por tres paredes de hueso y particularmente son estrechos y profundos presenta un pronóstico altamente favorable debido a su configuración espacial. Los estudios revelan que después del desbridamiento quirúrgico completo de los defectos de tres paredes, se consigue >50% del relleno óseo, la regeneración ósea de los defectos intraóseos dependen de distintas variables como son: la disponibilidad de elementos vasculares y celulares, así como el soporte estructural inherente proporcionado por el hueso alveolar circundante, que puede influir en el mantenimiento del espacio y la estabilidad del coágulo; los defectos intraóseos se vuelven cada vez más limitados debido a la disminución del número y de la altura de las paredes óseas, así como del ángulo de los defectos, todos estos factores intervienen en la capacidad de regeneración periodontal. En consecuencia, tales defectos intraóseos (por ejemplo, 1 y 2 paredes) a menudo se manejan utilizando una combinación de estrategias de ingeniería de tejidos para su tratamiento^(15,16).

Es importante mencionar que hay otro tipo de defectos óseos que involucran estructuras más complejas de la zona craneomaxilofacial, donde las principales causas de estos defectos son malformación congénita, defectos del paladar hendido, traumatismos, infecciones y resección de tumores o quistes, estos defectos resultan un desafío para la ingeniería de tejidos, debido a la presencia de estructuras fisiológicas complejas, que

incluyen cartílago, rasgos del esqueleto facial, músculos, piel, ligamentos, vasos sanguíneos y nervios⁽¹⁴⁾.

1.3 Regeneración ósea

En el tejido óseo existe un dinamismo constante para lograr la homeostasis entre reabsorción y formación, dicho proceso está regulado por las células osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Cuando ocurre un trauma óseo (fractura) se activa una cascada de eventos osteogénicos, en los cuales participan una gran variedad de fenotipos celulares, moléculas biológicas de señalización y proteínas de la matriz los cuales son temporal y espacialmente estructuradas con el único objetivo de regenerar la fractura⁽¹⁷⁾.

Es importante mencionar que la regeneración ósea después de una fractura o lesión depende del tamaño del defecto causado, cuando se da la regeneración espontánea se conoce como defectos de tamaño subcrítico, sin embargo, las lesiones que no se regeneran espontáneamente y necesitan de otras estrategias para su regeneración se conocen como defectos de tamaño crítico. En consecuencia, la reparación ósea se puede definir en dos categorías: curación ósea primaria y curación ósea secundaria. La curación ósea primaria ocurre cuando la fractura es menor a 0.1 mm y el sitio de la fractura está rígidamente estabilizado, se caracteriza porque el proceso se llena directamente mediante osificación continua, con la ausencia de tejido cartilaginoso o conectivo^(17, 18).

La curación ósea secundaria se caracteriza cuando los bordes de la fractura tienen menos del doble del diámetro del hueso lesionado, es la forma más común de curación ósea y se produce una serie de eventos fisiológicos como la coagulación sanguínea, la respuesta inflamatoria, la formación de callos de fibrocartílago, la osificación intramembranosa y endocondral y la remodelación ósea. Todos estos procesos están regulados metabólicamente. En primer lugar, inicia la actividad anabólica, aumentando el volumen óseo a través del reclutamiento de células troncales comprometidas al linaje óseo y la apoptosis de los condrocitos. La actividad anabólica continúa en una fase prolongada, hasta la reducción del volumen del tejido calloso el cual es una característica de la fase catabólica, cuando el lecho vascular aumenta y la tasa de flujo vascular vuelve al nivel previo a la lesión, la fase catabólica alcanza el período final⁽¹⁹⁾.

Como se ha mencionado anteriormente el defecto óseo segmentario o de tamaño crítico son un reto para el área de la ingeniería de tejidos óseos, debido a la falta de unión causada

por dichos defectos que influye en gran medida en la calidad de vida de los pacientes debido a los costos prolongados y postoperatorios del tratamiento y también al desafío quirúrgico, socioeconómico y de investigación. En la actualidad, se utilizan defectos de tamaño crítico en modelo animal, para poder hacer frente a la problemática que implica regenerar tejido óseo en esas circunstancias⁽¹⁸⁾.

1.4 Tratamientos

El tratamiento quirúrgico actual para los defectos orales y craneofaciales se ha mejorado durante el último año. Hoy día, existen varias técnicas que se han utilizado (injertos autógenos, injertos alogénicos y materiales protésicos) para la reconstrucción ósea. Sin embargo, la ingeniería de tejidos ha sido un papel crucial en la regeneración ósea para los defectos craneofaciales, ya que son defectos comunes de tamaño crítico y su estructura y función complicadas a pesar del uso de injertos, ninguna de estas modalidades tiene que demostrar ser una herramienta consumada para la reconstrucción del hueso craneofacial, y en el caso de la regeneración periodontal es reconocida como una de las primeras disciplinas clínicas que se benefician de las nuevas tecnologías basadas en la ingeniería⁽²⁰⁾.

La ingeniería de tejidos periodontales tiene dos enfoques distintos para promover la regeneración, por un lado, el del hueso alveolar y por el otro de tejido conectivo que incluye (cemento y ligamento periodontal). Los tratamientos actuales para regenerar y reparar tejido periodontal, considera un abordaje conservador, acondicionamiento radicular, injertos, uso de membranas (regeneración tisular guiada), andamios o una combinación de varias de estas estrategias. Por lo que en la ingeniería tisular, los biomateriales, moléculas bioactivas (factores de crecimiento) y células (troncales) son tres factores críticos para la regeneración de tejidos óseos de los defectos craneofaciales y periodontales^(20, 21).

En esta sección se abordarán los principales tratamientos para la regeneración ósea, que incluyen el uso de injertos, andamios, células, factores de crecimiento etc.

Injerto óseo autólogo

El hueso autólogo sigue siendo considerado como el estándar de oro ya que todas las propiedades necesarias requeridas en la regeneración ósea, contiene células viables que pueden formar nuevo tejido óseo (osteogénico), proporciona un andamio para el crecimiento de células necesario para la regeneración ósea (osteoconductor); y promueve la proliferación de células madre y su diferenciación en células osteogénicas

(osteoinductivas). Es ideal en muchas situaciones porque se obtiene del propio paciente, por lo que es menos probable que sea rechazado y más probable que se incorpore. Sin embargo, el uso de un autoinjerto tiene limitaciones, que incluyen la morbilidad del sitio donante, la disponibilidad limitada de tejido, una operación adicional y un tiempo de curación prolongado. Las tasas de complicaciones mayores y menores de la cosecha autógena de injertos óseos han sido reportadas en 8.6% y 20.6%, respectivamente. Otras formas de injertos óseos, como los aloinjertos, los xenoinjertos y los injertos sintéticos, eliminan la necesidad de procedimientos secundarios y evitan las complicaciones en el sitio del donante. Sin embargo, el rechazo y la incorporación más lenta pueden ser desventajas para el uso de estos injertos. En el hueso bien vascularizado, como el calcáneo, se ha documentado que no hay diferencias en la tasa de complicaciones en el sitio de la osteotomía entre el autoinjerto y los aloinjertos. Sin embargo, en áreas menos vascularizadas, la incorporación puede ser difícil^(21,22).

Aloinjertos

El hueso aloinjerto se extrae de donantes humanos, principalmente cadáveres. Está disponible en varias formas y tamaños, evitando la necesidad de sacrificar la estructura del huésped y sin morbilidad en el sitio del donante. Las desventajas incluyen la infección como la transmisión del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus linfocítico T humano (HTLV), la hepatitis no especificada, la tuberculosis y otras bacterias han sido documentados para aloinjertos (principalmente de aquellos que contienen células viables) y resistencia inmune. Por otro lado, los aloinjertos se obtienen de humanos y se someten a procesos de esterilización vigorosos antes de que estén listos para que los cirujanos los utilicen; se pueden preparar utilizando una combinación de diferentes procedimientos. El hueso de aloinjerto de cadáver está disponible en forma esponjosa o cortical, o como matriz ósea desmineralizada (DBM), los aloinjertos son principalmente osteoconductores, mientras que la DBM se procesa de tal manera que retiene las propiedades osteoinductivas. En general, los injertos de huesos alogénicos se pueden clasificar en tipos frescos, congelados, liofilizados y desmineralizados, según el proceso de preparación. Aunque un proceso de esterilización más vigoroso puede eliminar las posibilidades de transmisión de enfermedades e infecciones, también puede reducir las propiedades osteogénicas y osteoinductivas. En general, los injertos más frescos son más caros y están menos disponibles que otros injertos que tienen una vida útil más larga⁽²²⁾.

Xenoinjertos

Un xenoinjerto proviene de una especie no humana. Son materiales con sus componentes orgánicos totalmente eliminados con su eliminación, la preocupación por las reacciones inmunológicas se vuelve inexistente. Por lo tanto, la antigenicidad es significativamente mayor que la de los aloinjertos. La estructura inorgánica restante proporciona una matriz arquitectónica natural, así como una excelente fuente de calcio. El material inorgánico también mantiene la dimensión física del aumento durante las fases de remodelación. Naturalmente, requiere un procesamiento más estéril, lo que puede resultar en una reducción de las propiedades osteoinductivas. Sin embargo, debido a la abundancia de donantes, estos injertos pueden ser menos costosos y más fácilmente disponibles. También debido a los extensos procesos de esterilización, la vida útil es generalmente larga. El injerto óseo xenógeno más común utilizado en la cirugía ortopédica es la hidroxiapatita ósea natural porosa de huesos de animales (bovinos, equinos, porcinos, etc.) que también forman parte de este grupo. Los materiales filogénicos, como el fosfato de calcio análogo al hueso obtenido originalmente de algas marinas o materiales derivados de coral, también se incluyen en esta categoría^(19,20,23).

Substitutos óseos

Un sustituto óseo puede definirse como un biomaterial sintético, inorgánico, orgánico o combinado, el cual puede ser insertado para un tratamiento en defectos óseos. Un material sustituto de hueso ideal debería ofrecer, una estructura tridimensional, que contenga células osteogénicas y factores osteoinductivos, que tenga propiedades mecánicas suficientes y promueva la vascularización. Se resume las diferentes modalidades en la figura 1⁽²⁴⁾.

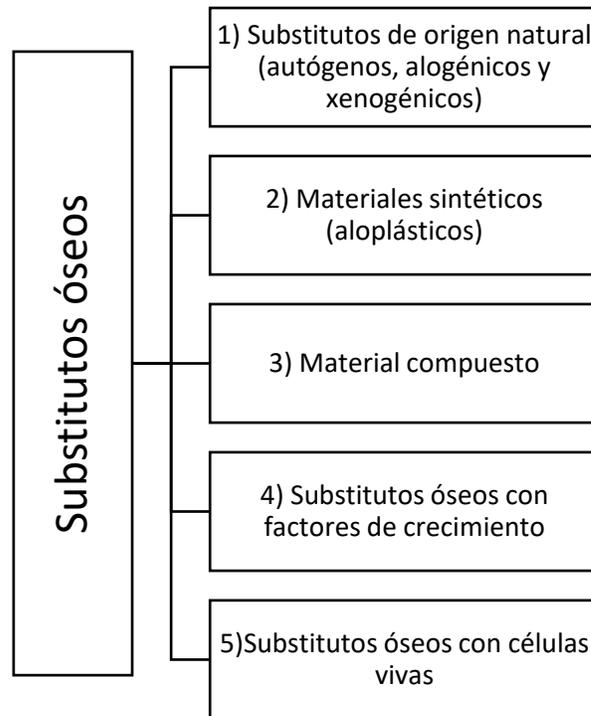


Figura 1. Sustitutos óseos utilizados para el tratamiento de defectos en el tejido óseo. Fuente propia.

Materiales sintéticos (aloplásticos)

El hueso artificial se puede crear a partir de cerámicas como los fosfatos de calcio, bioglass y sulfato de calcio que son biológicamente activos dependiendo de la solubilidad en el entorno fisiológico. La naturaleza variable de estos materiales de injerto (porosidad, geometrías, diferentes solubilidades y densidades) determinará la reabsorción de los materiales de injerto basados en fosfato de calcio. Los biocerámicos no son osteogénicos ni osteoinductivos, pero funcionan creando un andamio osteoconductor para promover la osteosíntesis. Hoy día hay cuatro tipos principales de biocerámicos disponibles: sulfato de calcio, fosfato de calcio, fosfato tricálcico e hidroxapatita coralina; los biocerámicos compuestos utilizan una combinación de estos tipos para proporcionar materiales con propiedades mejoradas^(3,21,24).

El titanio metal también pertenece a este grupo. Además, los polímeros que incluyen polimetilmetacrilato (PMMA), polilactidas / poliglicolida y copolímeros, así como policaprolactona (PCL) se resumen en este grupo⁽²¹⁾.

Materiales compuestos

BSM combina diferentes materiales, como cerámicos y polímeros, con el objetivo de modificar las características más favorables para fusionar materiales con diferentes propiedades estructurales y bioquímicas⁽²⁴⁾.

BSM combinado con factores de crecimiento

La mayoría de los sustitutos del injerto óseo, especialmente las cerámicas sintéticas y el cemento, no poseen ninguna propiedad osteoinductiva. Los factores de crecimiento que se presentan en el sitio de la lesión ósea durante la curación ósea son de importancia crítica porque son osteoinductivos y esta es la razón por la que se utilizan los factores de crecimiento e injertos^(20,24).

Los factores y proteínas que existen en el hueso son responsables de regular la actividad celular. Los factores de crecimiento se unen a los receptores en las superficies celulares y estimulan el ambiente intracelular para actuar. En general, esta actividad se traduce en una proteína quinasa que induce una serie de eventos que resultan en la transcripción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y, en última instancia, en la formación de una proteína para su uso intracelular o extracelular^(19,24).

Los factores de crecimiento con injertos mejorados se producen utilizando tecnología de ADN recombinante. Consisten en factores de crecimiento humano o morfógenos (BMP junto con un medio portador, como el colágeno), como factores de crecimiento naturales o recombinantes, como una Proteína Morfogénica Ósea (BMP), Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β), Factor de Crecimiento Tipo Insulina 1, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y Factor de Crecimiento de Fibroblastos. Las Proteínas Morfogénicas Óseas (BMP), que promueven la osteoinducción mediante la unión a receptores transmembrana específicos en células madre mesenquimales, osteoblastos y condrocitos maduros, son posiblemente los factores de crecimiento más ampliamente investigados en el tratamiento de defectos esqueléticos, principalmente BMP-2 y BMP-7 miembros de la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β)^(20,24).

BMP-2 es capaz de inducir la diferenciación osteoblástica de las células madre mesenquimáticas, y BMP-7 puede promover directamente la angiogénesis, ambas tienen un papel importante en las propiedades osteoinductivas⁽¹⁹⁾.

Plasma rico en plaquetas (PRP)

El PRP se puede definir como una porción de la fracción plasmática de sangre autóloga con un recuento de plaquetas por encima del valor basal, estas plaquetas concentradas se suspenden en un pequeño volumen de plasma, el PRP es más que un simple concentrado de plaquetas; también contiene las proteínas en la sangre que se sabe que actúan como moléculas de adhesión celular para la osteoconducción y como matriz para la migración de los huesos, el tejido conectivo y el epitelio. Estas moléculas de adhesión celular son la fibrina, la Trombospondina (TSP) -1, la Fibronectina y la Vitronectina. Los otros componentes notables de PRP incluyen el Factor de Crecimiento Transformante (TGF) - β , cuya función principal es estimular la proliferación de células mesenquimales indiferenciadas, regula la mitogénesis endotelial, fibroblástica y osteoblástica y regula la síntesis de colágeno y la secreción de colagenasa, Factores de Crecimiento Derivados de las Plaquetas (PDGF) -AB y PDGF-BB) sus funciones son mitogénicas para células mesenquimales y osteoblastos, estimula la quimiotaxis y la mitogénesis en fibroblastos, gliales o células de músculo liso, Factor de Crecimiento Similar a la Insulina (IGF) mejora la formación ósea y quimiotáctica para fibroblastos y estimula la síntesis de proteínas el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) estimula la quimiotaxis endotelial o la angiogénesis y regula la secreción de colagenasa, el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) -2 promueve el crecimiento y la diferenciación de condrocitos y osteoblastos conectivos. El Factor de Crecimiento Tisular (CTGF) promueve la angiogénesis y la regeneración del cartílago, el Factor Plaquetario 4 (PF-4) estimula el influjo inicial de neutrófilos en las heridas y el quimio atrayente para los fibroblastos, la Interleucina 8 (IL-8) mediador proinflamatorio y el reclutamiento de inflamatorias células, el Factor de Crecimiento de Queratinocitos (KGF) promueve el crecimiento, la migración, la adhesión y la supervivencia de las células endoteliales⁽²⁵⁾.

En el campo de la ingeniería ósea, el PRP utiliza la formación ósea porque estimula la diferenciación osteoblástica de mioblastos y células osteoblásticas en cultivos tridimensionales en presencia de la proteína morfogenética ósea BMP-2, BMP-4, BMP-6 o BMP-7. Estos resultados sugirieron que las plaquetas no solo contienen factores de crecimiento para la proliferación sino también nuevos potenciadores para la diferenciación osteoblástica dependiente de BMP. Esta es la razón porque PRP podría ser osteoinductivo cuando se usa en injertos^(25,26).

BSM con células vivas

Las células troncales mesenquimales, las células estromales de la médula ósea, las células periósticas, los osteoblastos y las células madre embrionarias y adultas se han utilizado en la ingeniería de tejidos óseos, ya que tienen el potencial de aumentar el rendimiento de los sustitutos actuales de injertos óseos y son el foco de gran parte de la investigación en curso. El candidato más probable para tales terapias sigue siendo la célula troncal mesenquimatosa (MSC, por sus siglas en inglés) por sus características, inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Las MSC pueden modular la respuesta inmune al inducir la apoptosis de las células T, la cual es una característica importante cuando se utilizan biomateriales para aplicarlos como terapia, en la ingeniería de tejidos⁽²⁰⁾.

El objetivo del andamio con la célula es lograr la adhesión celular, la proliferación, diferenciar y formar los tejidos requeridos. Otra estrategia es la implantación de un andamio acelular en el defecto y el cuerpo puede poblar el andamio con células. Se pueden elegir varios biomateriales para combinarlos con las células, según el objetivo (resistencia mecánica o relleno) y el enfoque (percutáneo o quirúrgico). Los biomateriales más utilizados para la regeneración ósea son las cerámicas de fosfato de calcio, que generalmente combinan hidroxiapatita y fosfato de β -tricalcio como gránulos u otras moléculas inorgánicas. Sin embargo, también se pueden usar polímeros naturales y sintéticos. Todos ellos son ejemplos de usos de biomateriales como andamios⁽²³⁾.

Andamio

El andamio es un marco y soporte mecánico para la migración celular, la proliferación y la diferenciación y su función principal es imitar la matriz extracelular (ECM). La propiedad principal es la porosidad ya que facilita el crecimiento celular y la vascularización y el proceso de biodegradación. Otras características importantes son la biocompatibilidad, la química de la superficie, las propiedades mecánicas y la topografía que podrían ayudar a las interacciones entre las células y el material⁽²⁶⁾.

Los estudios han demostrado que la arquitectura de andamios modifica la respuesta de las células y se ha demostrado que la posterior formación de tejido y la topografía de nano a microescala afectan el comportamiento de las células mediante la modificación de los arreglos del citoesqueleto. Los polímeros naturales, los polímeros sintéticos y las cerámicas se han investigado con éxito para ser aplicados en el desarrollo de andamios. Los polímeros sintéticos más comunes son poli (α -hidroxi éster) como poli (ácido glicólico) (PGA), poli

(ácido láctico) (PLA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL) y sus copolímeros. Estos polímeros se descomponen por hidrólisis de los enlaces éster, sus productos de degradación se reabsorben en algunos casos a través de las vías metabólicas y sus estructuras pueden adaptarse modificando sus tasas de degradación. En el caso de los polímeros naturales se encuentran alginato, quitosán, almidón, celulosa, colágeno, fibroína de seda y albúmina. Estos polímeros son con frecuencia una opción utilizada para aplicaciones de regeneración de tejidos porque pueden imitar más de cerca la ECM y pueden mejorar el reconocimiento biológico en el tejido nuevo en crecimiento⁽²⁷⁾.

1.5 Defectos de tamaño crítico en animales

Schmitz y Hollinger (1986) definieron originalmente el término "defecto de tamaño crítico" (CDS) como "la herida intraósea de tamaño más pequeño en un hueso particular y en una especie que no se curará espontáneamente durante la vida del animal"⁽²⁸⁾.

Li *et al.* (2015) definieron que la CSD "puede no curarse espontáneamente y llevar a un pronóstico de no unión, debido al tamaño de los defectos o las propiedades biomecánicas inestables, el entorno desfavorable de la herida, la técnica quirúrgica subóptima, los factores metabólicos, las hormonas, la nutrición y el estrés aplicado". Existen diversos parámetros para establecer la CSD según el modelo animal y los sitios de defectos. Estos autores mencionan, que no habrá una regeneración ósea completa cuando la lesión presente un área mineralizada $\geq 30\%$ después de 52 semanas, y la deficiencia ósea sea de una longitud superior a 2-2.5 veces el diámetro del hueso afectado, a estas características en conjunto se le llama defecto de tamaño crítico⁽²⁹⁾.

Por otro lado, el modelo animal se ha estado utilizando como estándar de oro para la evaluación del defecto óseo de tamaño crítico, como rata / ratón, conejo, perro, oveja, cabra y cerdo. Sin embargo, se deben considerar varios factores para seleccionar una especie animal específica como modelo de prueba. Uno de los factores principales son las analogías fisiológicas y fisiopatológicas con los humanos, citando a Gomes 2011: "La selección de modelos preclínicos a menudo toma en cuenta el árbol filogenético; sin embargo, si se puede lograr utilizando animales pequeños, como roedores, es preferible"⁽²⁹⁻³¹⁾.

Con respecto a la regeneración ósea, los roedores pueden presentar varias ventajas, como una mejor relación costo-efectividad, un alojamiento más fácil y manejable para operar, y

permiten la estandarización de condiciones experimentales en individuos genéticamente similares y observan una multiplicidad de objetos de estudio después de la cirugía en un período de tiempo corto^(29,32). Existen diferentes sitios de defectos óseos que se utilizan para evaluar los sustitutos del injerto óseo, pero los principales defectos se realizan en la bóveda craneal, el fémur o el defecto segmentario, el cúbito, el defecto cortical parcial y los modelos de defectos del hueso esponjoso. Los defectos óseos segmentarios y en la calvaria son los más ampliamente descritos y utilizados en la literatura⁽³³⁾.

El modelo en la bóveda craneal, se ha utilizado ampliamente por las siguientes razones: el hueso en la calvaria es un defecto estandarizado que permite la creación de un defecto circular uniforme, utilizando una trepano con irrigación salina, se extrae el hueso remanente para evitar daños al cerebro, los injertos no requieren fijación debido al soporte provisto por la duramadre y la piel que lo cubre; este modelo permite la comparación precisa de una variedad de injertos o andamios y análisis radiográficos e histológicos^(33,34). Aunque los defectos de los huesos segmentarios en huesos largos se pueden usar para imitar más de cerca el escenario clínico⁽³⁵⁾.

II.- Antecedentes

2.- Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos comenzó hace aproximadamente tres décadas y ha tenido un crecimiento acelerado desde entonces, debido a que se enfoca en opciones de tratamiento alternativas que eliminan idealmente los problemas de los tratamientos clínicos utilizados actualmente (es decir, la morbilidad del sitio donante, la disponibilidad limitada, el rechazo inmune y la transferencia de patógenos)⁽³⁶⁾.

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario que combina biología, medicina e ingeniería y su principal objetivo es el mejorar la regeneración y reparación ósea, utilizando andamios, células madre o biomoduladores. Sin embargo, los andamios pueden ser celulares o acelulares es decir que en el momento de su fabricación el biomaterial del que es creado el andamio, tiene encapsulado células u otras biomoléculas, y un andamio acelulares cuando el biomaterial es fabricado sin ningún tipo de elemento biológico o celular, porque la misma arquitectura y la geometría promoverán el reclutamiento de células madre locales y / o células osteoprogenitora, lo que podría ser posible con señales "inteligentes" y motivos de unión dentro de la arquitectura del andamio, además de que esta

microarquitectura debe permitir la vascularización para el suministro de nutrientes en el tejido en crecimiento. Por tanto, la ingeniería de tejidos busca imitar la matriz extracelular (MEC), del hueso natural para mejorar significativamente las respuestas biológicas⁽³⁷⁻³⁹⁾.

Además, en la última década, el campo de la ingeniería de tejidos funcional ha crecido para abarcar temas relacionados con las interacciones mecanobiológicas entre las células y los andamios, es decir las células dentro de los andamios se someten a un entorno biomecánico complejo y tales señales físicas pueden influir significativamente en el crecimiento celular, la diferenciación y el metabolismo. En consecuencia, se requiere mayor información tanto del entorno mecánico *in vivo* como de la respuesta de las células a estas señales con el fin de mejorar o acelerar la regeneración de tejidos⁽⁴⁰⁾.

2.1 Andamios o constructos para la regeneración ósea

El andamio es un soporte mecánico y estructural para la migración, proliferación y diferenciación celular donde el objetivo principal es imitar la matriz extracelular (ECM). El sistema biomecánico del hueso es complejo, por lo que un andamio ideal necesita diversos requisitos.

- **Biocompatibilidad:** Capacidad para soportar la actividad celular normal, incluido el sistema de señalización molecular, sin efectos tóxicos locales y sistemáticos en los tejidos del huésped. Y debe evocar una respuesta biológica específica en la interfaz del material, que resulta en la formación de un enlace con los tejidos^(40,41).
- **Propiedades mecánicas:** Las propiedades mecánicas del hueso varían ampliamente desde el hueso esponjoso hasta el hueso cortical. El módulo de Young del hueso cortical tiene entre 15 y 20 GPa, el del hueso esponjoso está entre 0.1 y 2 GPa. La resistencia a la compresión varía entre 100 y 200 MPa para el hueso cortical y entre 2 y 20 MPa para el hueso esponjoso. La gran variación en las propiedades mecánicas y la geometría hace que sea difícil diseñar un "andamio ideal para huesos"⁽⁴¹⁾.
- **Tamaño del poro:** Una propiedad que debe tener el andamio es la porosidad interconectada, donde el tamaño del poro debe ser de al menos 100 micras de diámetro para la difusión exitosa de nutrientes esenciales, oxígeno y productos de desecho para la supervivencia de las células. Como reportan Asa'ad *et al*, el hueso esponjoso humano demuestra una porosidad total entre el 30% y el 90%, cualquier andamio que contenga vacíos dentro de este rango se considera adecuada para la regeneración ósea, ya que la

alta porosidad puede poner en peligro la estabilidad mecánica general de un andamio reduciendo su resistencia general a la compresión. Sin embargo, la creación de gradientes en un andamio poroso puede inducir una angiogénesis más rápida. Y, los tamaños de poros en el rango de 200-350µm se encuentran para ser óptimos para el crecimiento de los tejidos óseos^(40,41).

- Bioreabsorbible. La bioreabsorbilidad es otro factor crucial para los andamios en la regeneración de tejidos óseos. La principal ventaja es que el andamio no requerirá un segundo evento quirúrgico para su eliminación, ya que podrá degradarse con el tiempo *in vivo*, preferiblemente a una tasa de reabsorción controlada y creando espacio para que crezcan los nuevos tejidos óseos⁽⁴²⁾.

2.2 Técnicas de fabricación 3D

Existen varios métodos de fabricación de andamios en tercera dimensión (3D), como la fundición con solvente o la lixiviación de partículas, la formación de espuma con gas, la separación de fases y electrohilado. Sin embargo, tienen muchas limitaciones, en comparación con la tecnología de impresión en 3D que ha surgido como una herramienta valiosa porque puede diseñar andamios para que coincida con la geometría de un defecto que permite predecir una mayor integración, porque mejora la interacción del andamio y del huésped^(42,43).

Fundición con solvente o lixiviación de partículas

Esta técnica se fundamenta, en el uso de una solución de polímero que se disuelve en un solvente con partículas de sal distribuidas uniformemente de un tamaño específico. El disolvente se deja evaporar, dejando atrás una matriz con partículas de sal. Esta matriz de polímero se sumerge luego en agua para permitir la lixiviación de la sal. Esto da como resultado la formación de una matriz 3D porosa que se puede utilizar para sembrar diferentes tipos de células. El tamaño de los poros del andamio está en función del diámetro de las partículas de sal. La matriz polimérica resultante está libre de sal en un 99,9%, y puede tener más del 90% de porosidad y diámetros de poros de hasta 500 µm. Una de las mayores ventajas de esta técnica es que el tamaño del poro y, a su vez, las propiedades mecánicas del andamio se pueden ajustar fácilmente mediante el control del tamaño y la geometría del porógeno. Sin embargo, la principal desventaja de la técnica es el uso de

disolventes orgánicos citotóxicos, además el andamio necesita ser lavado repetidamente para asegurar la eliminación completa de los solventes y minimizar la muerte celular⁽⁴³⁾.

Separación de fase inducida térmicamente

Esta técnica se fundamenta en crear andamios porosos interconectados, mediante la reducción de la temperatura polímero/disolvente a través de la temperatura crítica superior del disolvente. El proceso consiste en una solución de polímero (sintética o natural) se enfría por debajo de su punto de congelación, lo que lleva a la solidificación de las moléculas del disolvente. Esto obliga al polímero a agregarse en los espacios intersticiales del andamio. El disolvente se evapora luego por liofilización, y esto deja una estructura polimérica con poros interconectados que se pueden usar para sembrar las células. El tamaño de los poros del andamio está en función del régimen de congelación, la concentración del polímero, el tamaño de los cristales de hielo (disolvente) y el pH de la solución. Aunque hay una variedad de polímeros que se pueden liofiliza, el tiempo prolongado y el alto consumo de energía de este proceso, por lo que limitan su uso para aplicaciones de ingeniería de tejidos. Además, esta técnica también utiliza solventes citotóxicos para mezclar el polímero, y cualquier exposición a solventes residuales puede ser potencialmente letal para las células^(43,44).

Espuma con gas

Esta técnica consiste en utilizar un andamio polimérico, el cual está saturado con un agente espumante tal como el dióxido de carbono, nitrógeno o agua a altas presiones. El fundamento consiste en disminuir la presión del agente espumante, lo que provoca la solubilidad del gas en el polímero, provocando burbujas de gas que crecen sobre el polímero, como resultado de la inestabilidad termodinámica. Con esta técnica se puede formar una estructura porosa con tamaños de poros que varían de 100 a 500 μm en el andamio. Una de las mayores ventajas de esta técnica para aplicaciones de ingeniería de tejidos es el uso de agentes espumantes relativamente inertes sin la participación de disolventes citotóxicos. Sin embargo, se ha informado que solo el 10-30% de los poros están interconectados en el andamio, lo que puede presentar limitaciones de difusión para las células encapsuladas en el andamio⁽⁴¹⁻⁴³⁾.

Electrohilado

Esta técnica proporciona un método para sintetizar andamios que imiten la matriz extracelular nativa, actuando como un entorno natural para las células durante la regeneración ya que las fibras tienen un tamaño de nano a micras. El fundamento de esta técnica implica el bombeo de una solución de polímero a través de una punta de aguja que se coloca a una distancia designada de un colector conectado a tierra o con carga opuesta. Cuando se aplica un voltaje en la punta de la aguja, la fuerza electrostática dentro de la gota supera la tensión superficial, lo que hace que salga un chorro de líquido de la aguja. El chorro cargado eléctricamente experimenta una inestabilidad de flexión que lo hace girar rápidamente en múltiples bucles de expansión a medida que viaja hacia el colector, el andamio resultante es una matriz de fibra no tejida con geometría dictada por el colector y la configuración de electrohilado (figura 2)⁽⁴⁴⁾.

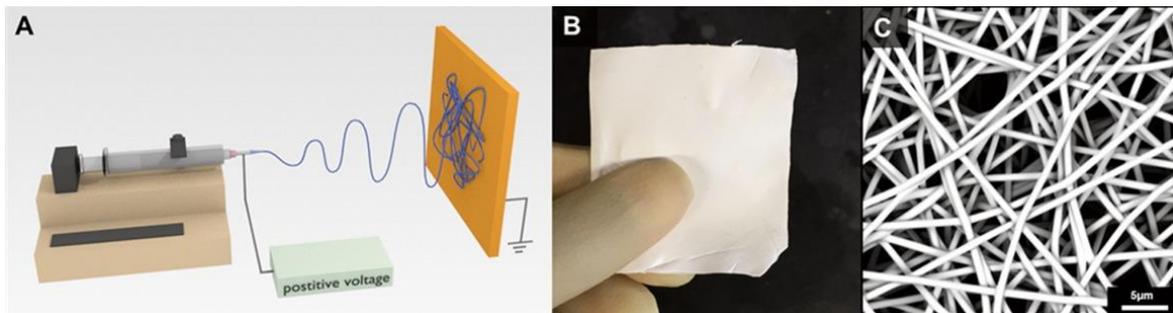


Figura 2 Técnica de electrospinning. A) Instalación de electrospinning B) Macroimagen de una malla de electrohilado C) Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) de una malla de electrohilado. Imagen tomada de Kishan et.al.⁽⁴⁴⁾

Bioimpresión 3D

Como se mencionó con anterioridad, la bioimpresión ha surgido como una estrategia atractiva en la ingeniería de tejidos, debido a que fabrica andamios con arquitecturas complejas en un tiempo rápido, y su resolución de impresión es de 10-10000 μm , que es una amplia gama de flexibilidad en comparación con otros métodos de fabricación 3D. La impresión 3D se fundamenta en la técnica de manufacturación aditiva la cual consiste en la deposición del material capa por capa, con células encapsuladas o que las células se siembren posteriormente a la impresión. Hay dos métodos básicos de bioimpresión: basados en gotas y extrusión. En la bioimpresión basada en gotas, a veces denominada impresión de inyección de tinta debido a sus orígenes en impresoras de inyección de tinta

modificadas, un cabezal de impresión mecánico deposita el enlace biológico en gotitas que pueden unirse y gelificarse para formar estructuras poliméricas. La bioimpresión por extrusión, utilizan una plataforma mecánica de tres ejes (X, Y y Z) que controlan los movimientos de los extrusores que imprimen la biotinta con la forma y algoritmos requeridos. El movimiento de esta plataforma se rige por las coordenadas creadas por el diseñador y guardadas en un formato de archivo como g-code que la impresora podría seguir fácilmente. El desarrollo y la aplicación de estas tecnologías 3D ha ido aumentando constantemente durante los últimos años, debido a la deposición precisa del material, la rentabilidad, la simplicidad y la capacidad de control de la distribución celular⁽⁴⁵⁾.

Por otro lado, un componente clave de la bioimpresión es la llamada “biotinta”. La biotinta es un biomaterial que contiene células vivas que imitan el entorno de la matriz extracelular, apoyando la adhesión celular, proliferación, y la diferenciación después de la impresión. Estos materiales deben contar con una temperatura de impresión que no supere la temperatura fisiológica, condiciones de entrecruzamiento o de gelificación suaves y componentes bioactivos que no son tóxicos y pueden ser modificados por las células después de la impresión. A continuación, se describen los métodos de impresión basados en extrusión e inyección y se incluyen los de estereolitografía y asistido por láser^(45,46).

Modelado por Deposición Fundida (FDM)

El modelado por deposición fundida consiste como su nombre lo dice en depositar el material termoplástico en una consistencia fundida, extruyendo el material en capas delgadas en una superficie plana, construyendo el modelo tridimensional capa por capa. Esta técnica es económica y relativamente rápida. Sin embargo, también se esfuerza por replicar geometrías complejas, debido a que el termoplástico no puede sostenerse inmediatamente cuando se deposita. La resolución de las construcciones generadas por FDM está limitada por el diámetro de la boquilla y los materiales disponibles (termoplásticos sintéticos y compuestos con cerámicas y metales). El tamaño de la boquilla determina parcialmente el tamaño mínimo de la característica, pero existe una variación entre el momento en que el plástico abandona el orificio de la boquilla y antes de que entre en

contacto con la cama de impresión. La mayoría de las aplicaciones en la regeneración de tejidos de FDM se enfoca en tejido musculoesquelético, debido a que los materiales son más duros y compatibles con el hueso o el tejido muscular denso. La FDM es ideal para pruebas de flujo, planificación quirúrgica y piezas de demostración, debido a la facilidad y velocidad de impresión de muchos modelos u objetos de gran formato ^(45- 48) (figura 3).

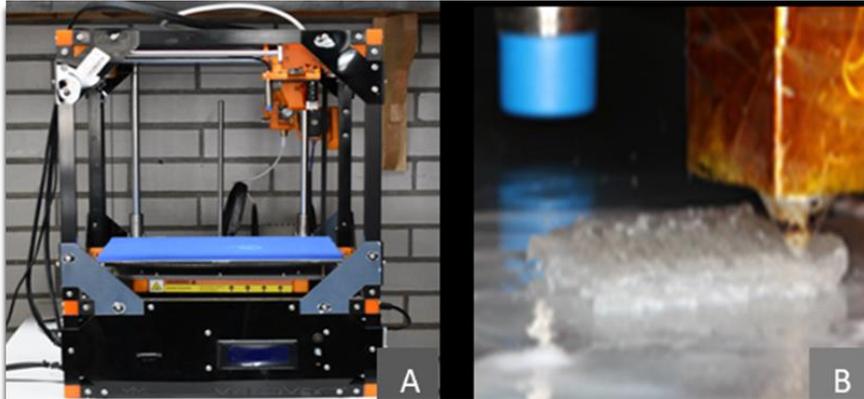


Figura 3. Modelado por deposición fundida (FDM). A) Impresora MakerBot B) Deposición de polímero PLA capa por capa. Fuente propia

Sinterización asistida por láser (SLS)

En esta técnica, un rayo láser con longitud de onda amplia o una fuente de luz de alta energía dirigida localmente, funde y fusionan directamente el polvo o un aglutinante polimérico sobre la superficie del lecho. Las capas de polvo fresco se suministran continuamente después de crear cada capa. SLS tiene una amplia resolución y gama de materiales. Sin embargo, las máquinas son costosas y lentas, su uso está relacionado a la industria maquinaria, pero en los últimos años SLS ha ido creciendo en popularidad entre los ingenieros de tejidos que buscan diseñar tejidos rígidos, como el hueso, no obstante, la biocompatibilidad de los materiales comerciales necesita mejoras⁽⁴⁹⁾.

Las principales diferencias entre la técnica FDM y SLS son en los procesos de fabricación de los biomateriales, en la primera técnica el material debe estar en una consistencia filamentosa y en la segunda técnica el material necesita estar pulverizado a un tamaño controlado para su implementación en máquinas SLS⁽⁴⁷⁾.

Estereolitografía (SLA)

Esta técnica construye modelos tridimensionales, a través de la polimerización capa por capa de una resina fotosensible. Los datos de entrada son la representación CAD del modelo. Un dispositivo SLA normalmente consiste en un contenedor lleno de resina líquida

(resina acrílica o epoxi), una plataforma elevadora móvil dentro del contenedor, un láser ultravioleta con óptica de enfoque de haz en la parte superior y un sistema de espejo deflector para controlar el haz de láser. La resina sin curar permanece líquida, lo que facilita su eliminación. Dentro de sus principales ventajas se encuentra que tiene la mayor resolución dentro de las bioimpresoras, además permite incorporar nanomateriales, así como factores de crecimiento. Sin embargo, el proceso es relativamente lento y los sistemas comerciales utilizan resinas no biomiméticas patentadas. A pesar de esto, SLA ha sido ampliamente utilizado en el área del consumidor y de la investigación. En la actualidad, los especialistas en biomateriales están trabajando en el desarrollo de resinas que sean adecuadas para su uso en aplicaciones de ingeniería de tejidos⁽⁴⁸⁾.

La impresión biológica por chorro de tinta utiliza una impresora de inyección de tinta modificada para depositar células encapsuladas en una biotinta en un sustrato elegido, llamado "biopaper". La biotinta no puede tener una alta viscosidad, lo que a menudo resulta en construcciones con malas propiedades mecánicas. Además, el tamaño pequeño de la boquilla daña las células, a su vez restringen el volumen depositado por gota lo que significa que se necesita altas concentraciones de células (más de 5 millones de células / mL) para maximizar la posibilidad de que cada gota de biotinta contenga una célula. Las ventajas de esta impresión 3D incluyen alta resolución y el potencial que imprima diferentes tipos de células juntas en el mismo andamio⁽⁴⁷⁾.

Aunque la mayor parte de la impresión biológica mediante inyección de tinta es la impresión de células vivas, algunos investigadores han tomado el concepto y han desarrollado un método para crear andamios rígidos, combinando el concepto de capas depositando el biomaterial en forma de esferoides que se fusionarán en un andamio 3D con un aglutinante líquido dispensado desde un sistema similar a una inyección de tinta. El cabezal de impresión deposita selectivamente un material adhesivo que une las perlas sueltas en la geometría diseñada. Este proceso funciona con varios materiales, es razonablemente barato en comparación con otras modalidades y evita daños en los nanomateriales, factores de crecimiento o péptidos integrados⁽⁴⁶⁾.

Bioplotting

Esta técnica se refiere a la extrusión de tubos o esferoides en capas uno encima de otro en un "biopaper". La radiación, la reacción química o la solidificación curan el material después de la impresión. En una etapa de post-procesamiento, la construcción se transfiere a un

biorreactor y las esferas de biotinta se fusionan. El “biopaper”, es un hidrogel, que se puede quitar después de la construcción si es necesario. Las bioimpresoras pueden tener un diseño a chorro o funcionar como una extrusora mecánica, la más común es por chorro las cuales tienen varias jeringas que contienen distintos tipos de células para permitir la fácil integración de múltiples tejidos en el andamio final. En la actualidad, es uno de los métodos más fáciles y populares para la creación de andamiajes co-cultivados y construcciones de tipo tejido / órgano debido a la posibilidad de incluir múltiples jeringas en bioprinters^(45,46).

3.- Células troncales

Las células troncales se caracterizan por su capacidad de autorrenovación que se refiere a la capacidad de división de las células para perpetuarse a sí mismas por largos periodos de tiempo y a su potencialidad, la cual se define como la capacidad de diferenciación a distintos linajes celulares. De manera general, podemos decir que hay dos tipos de células troncales: las embrionarias y somáticas. Las células troncales embrionarias son aquellas que provienen de la masa interna del blastocito, y pueden diferenciarse a células de las tres capas embrionarias, por lo que uso de estas células es polémico, debido a que se interrumpe el desarrollo del embrión y la posibilidad de formar teratomas⁽⁴⁹⁾.

Por otro lado, las células troncales somáticas, se consideran células especializadas que se pueden aislar de tejidos especializados, con potencial de diferenciación limitado. Otro tipo de células troncal somática son las llamadas células troncales pluripotentes inducidas (iPSC), las cuales se generan a través de la expresión inducida de factores de transcripción definidos, los cuales modifican el estado diferenciado de las células somáticas a un estado indiferenciado^(49,50).

3.1 Células troncales mesenquimales (MSC)

Algunos tipos de células troncales somáticas han sido ampliamente estudiadas en el campo de la medicina regenerativa, como las células troncales mesenquimales (MSC, del inglés *mesenchymal stem cells*), fueron descubiertas por Friedenstein en 1968 como una población celular parecida a los fibroblastos localizadas en la médula ósea. Estudios posteriores demostraron que las MSC pueden ser aisladas de varios tejidos adultos y neonatales (grasa, pulpa dental, líquido amniótico, sangre del cordón umbilical, placenta y gelatina de Wharton), además, de que tienen la capacidad para diferenciarse hacia diferentes tipos celulares de linaje mesenquimal, incluidos adipocitos, osteoblastos,

condrocitos, tenocitos, miocitos del musculo esquelético y células del mesodermo visceral. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las células mesenquimales tienen plasticidad celular, es decir que pueden generar células de linaje ectodermal y endodermal, tales como hepatocitos, neuronas y cardiomiocitos. De acuerdo con la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT por sus siglas en inglés) estableció criterios específicos para identificar a MSC 1) Deben purificarse a partir del estroma de la médula ósea y presentar adherencia al plástico en condiciones de cultivo celular estándar. 2) Cuando se realiza un estudio de citometría de flujo, debe ser positivos para los marcadores de superficie CD105, CD90 y CD73, expresar niveles bajos de Antígeno Leucocitario Humano (HLA-I, por sus siglas en inglés) y ser negativos para el Antígeno Leucocitario Humano (HLA-II, por sus siglas en inglés) CD11b, CD14, CD34, CD45 y CD31. 3) Se diferencian *in vitro* en condrocitos, osteocitos y adipocitos⁽⁵¹⁾. Por otro lado, las crecientes evidencias muestran que las MSC son poblaciones heterogéneas con diferentes orígenes y funciones, por lo tanto, faltan marcadores específicos para estas subpoblaciones de MSC. Los estudios de rastreo de linaje han implicado que Prx1, Dermo-1, Nestina, Gremlin 1 (un antagonista de BMP) y PDGFR α pueden marcar las MSC de la médula ósea^(52,53).

La MSC tienen alta capacidad de proliferación para expandirlas *in vitro* y obtener un número adecuado para protocolos de terapia celular. Estas poblaciones celulares tienen tres propiedades biológicas: Secreción de factores tróficos, amplia capacidad de diferenciación y propiedades inmunorreguladoras. que actualmente se utilizan en la regeneración de diversos tejidos entre ellos hueso, corazón, y para trasplantes de células hematopoyéticas, en pacientes con enfermedades hematológicas. Las MSC se han conceptualizado, como un sistema natural de reparación de tejidos, dada la efectividad como agente terapéutico al ser administrado de manera exógena en diversos modelos experimentales, se ha propuesto que la secreción de factores solubles es la principal responsable de modificar de manera positiva el microambiente del tejido dañado, propiciando así su regeneración. A esta propiedad de las MSC se le ha llamado “ actividad trófica” y por medio de análisis proteómicos se sabe que estas células pueden producir diversos factores, entre ellos péptidos neuroreguladores, citocinas, quimiocinas y Factores de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), Factor de Crecimiento Epidermico (EGF, por sus siglas en inglés), Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF, por sus siglas en inglés), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), Factor de Crecimiento de Fibroblasto (KGF, por sus siglas en inglés), Angipoyetina (Ang-1, por sus siglas en inglés), Motivo CXC Quimiocina 12 (CXCL-12, por sus siglas en inglés) y Factor

de Crecimiento Insulínico Tipo-1 (IGF-1, por sus siglas en inglés) que pueden influir en diversos eventos críticos como la regeneración de los tejidos, debido a que promueven la proliferación de fibroblastos, células endoteliales y células progenitoras residentes en los tejidos además de que favorecen la angiogénesis⁽⁵³⁾.

Por otro lado, el conocimiento sobre la capacidad inmunorreguladora de las MSC ha propiciado estudios de los efectos de estas células hacia tratamientos de enfermedades autoinmunes. Cuando las MSC se encuentran en un ambiente inflamatorio en presencia de citocinas proinflamatorias (IFN γ , TNF α e IL-1) secretados por células del sistema inmune, las MSC secretan moléculas involucradas en la regulación de la respuesta inmune como el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β 1, Por sus siglas en inglés), Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés), Prostaglandina E2 (PGE₂, por sus siglas en inglés), Indolamina (IDO, por sus siglas en inglés), Antígenos leucocitarios humanos G-5 (HLA-G5, por sus siglas en inglés), Interleucina-10 (IL-10, por sus siglas en inglés) y galectinas, además se expresan en membrana HLA-G1, Ligando 1 de Muerte Programada (PD-L1, por sus siglas en inglés), Moléculas de Adhesiones Intermoleculares ICAM-1, por sus siglas en inglés), Molécula de Citoadhesión Vascular-1 (VCAM-1, por sus siglas en inglés) y Proteína Jagged-1 las cuales están relacionadas con la tolerancia a los antígenos propios y el mantenimiento de la homeostasis, debido a que inhiben la proliferación de las células B, T, Natural killers, macrófagos M1 y células dendríticas, por el contrario promueven la maduración de los monocitos y la generación de células T reguladoras y macrófagos M2^(51,54).

Por otro lado, las MSC tienen propiedades que no han sido en su totalidad entendidas como su capacidad antiapoptótica en donde se han reconocido proteínas clave que interviene en dicho proceso como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF 1, por sus siglas en inglés), Interleucina 6 (IL-6) e incremento en la expresión de la proteína cinasa B (Akt por sus siglas en inglés), factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B por su siglas en inglés). Cuando se eleva la secreción de Akt se aumenta la secreción de la proteína secretada relacionada con frizzled 2, la cual forma parte de la vía de señalización Wnt que media el proceso antiapoptótico en células tipo fibroblastoide. Los efectos antiapoptóticos causan un aumento de la expresión de Bcl-2, Bcl-xL y la proteína de choque térmico mientras que, en la apoptosis relacionada con la hipoxia, se informa que la secreción del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) por las MSC aumenta significativamente, además de Factor de Crecimiento de Hepatocitos

(HGF, por sus siglas en inglés), y Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β 1, por sus siglas en inglés) tienen un papel en la reversión de la apoptosis de las células endoteliales. Otra característica de las células MSC, que no ha sido tan ampliamente estudiada es su propiedad antimicrobiana, se ha descubierto que estas células liberan diferentes polipéptidos, como las catelicidinas, las lisozimas, la lactoferrina y las defensinas, que tienen efectos antimicrobianos, principalmente la familia de las catelicidinas (hCAP-18/LL-37. LL-37) que combaten infecciones bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas. Este descubrimiento sugiere que las MSC son un agente terapéutico potencial para las infecciones agudas y sistémicas. Es importante mencionar que las MSC tienen presencia y participación en el desarrollo del cáncer al ser parte del microambiente tumoral, ya que las células tumorales liberan quimiocinas que atraen a las MSC (trofismo tumoral), las células troncales tienen una acción inmuno-moduladora que promueve la metástasis y la angiogénesis⁽⁵⁴⁻⁵⁷⁾.

3.2 Usos en la regeneración ósea

La terapia celular con células troncales mesenquimales ha sido ampliamente utilizada en la regeneración ósea, en particular para fracturas de no unión, causadas por traumas, insuficiencia sanguínea y otras condiciones. En el área de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, se utiliza andamios, factores de crecimiento y células MSCs para mejorar la regeneración ósea. Sin embargo, varios estudios sugieren que las MSC tienen el potencial de incrementar la osteoinducción y la osteogénesis⁽⁵⁶⁾.

En las fracturas óseas ocurren dos procesos biológicos importantes donde intervienen las MSC: Coagulación sanguínea e inflamación. La inflamación puede iniciar la cascada de señales para la regeneración ósea por la producción de factores quimiotácticos y en la segunda fase de inflamación crónica intervienen en la lesión macrófagos y linfocitos T helper. Los macrófagos tienen un papel crucial en la regeneración ya que no solo fagocita el tejido necrótico, microorganismos y hematoma, sino que también libera citocinas y factores de crecimiento que facilita la transición del estado inflamatorio al estado de reparación. Recientes investigaciones muestran que las MSC alogénicas promueven la polarización de los monocitos a un fenotipo del macrófagos tipo 2. Sin embargo, otros estudios revelan que las MSC pueden diferenciarse en fenotipos proinflamatorio o inmunosupresivo basados en los receptores tipo Toll. Cuando tienen un receptor TLR4,

presenta un fenotipo proinflamatorio y cuando tienen un receptor TLR3, presentan un fenotipo inmunosupresor⁽⁵⁵⁾.

Por otro lado, se ha sugerido que la rápida reparación ósea cuando se trasplanta MSC puede estar correlacionada con los bajos niveles de TNF- α en el callo óseo, esto favorece la formación de hueso desde que se reportó que TNF- α puede tener efectos proapoptóticos en los osteoblastos. Otro proceso en el que intervienen las MSC en la regeneración ósea es a través de la angiogénesis. En previos estudios sugieren que las MSC contribuyen a la capacidad regenerativa de los vasos sanguíneos incrementando la angiogénesis con la ayuda de las señales paracrinas. Algunos biomatrices como las plaquetas ricas en fibrina juegan un papel crítico como nicho biológico en estimular la residencia de MSC en el proceso de angiogénesis⁽⁵³⁾.

La literatura menciona que hay tres razones por la cuales ocurre la no unión en las fracturas en donde intervienen las MSC, la primera de ellas es por la falta de migración de MSC dentro del defecto óseo, la segunda es insuficiencia en el número de células osteoprogenitoras en los defectos de tamaño crítico y, por último, es que exista un proceso de diferenciación defectuoso. MSC expresan por lo menos 19 receptores de quimiocinas (CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5 y CXCR6) y además de CXCR4 y su ligando (CXCL12 o factor derivado estromal SDF1) son los mediadores más investigados en este proceso. Durante una fractura inicia una condición de hipoxia por el daño a los vasos sanguíneos que actúan como un reclutador útil de MSC y otras células progenitoras. La hipoxia puede expresar genes especiales que incrementan la supervivencia celular por la tensión de oxígeno bajo e induce el restablecimiento de vasos sanguíneos y la liberación de oxígeno. Debido a la condición hipóxica en el sitio lesionado, es posible que la expresión de quimiocina como SDF-1 este regulada por el ambiente y por el factor 1 inducible por hipoxia (HIF- α), lo que provoca la movilización de las MSC al sitio de fractura, además de la señales paracrinas de factores angiogénicos^(53, 55).

Aplicación clínica de las MSC

Las MSC se han utilizado en la ingeniería del tejido óseo para mejorar las opciones terapéuticas para mejorar la reparación ósea. Las MSC se han estudiado en una amplia variedad de especies animales, incluidos ratones, ratas, conejos, perros y caballo, debido que al igual que en los humanos se pueden aislar las células lo que permite tener un enfoque cercano para comprender los mecanismos de regeneración de estas células.

Oryan *et. al* menciona que las estrategias en el área de la regeneración ósea se pueden clasificar en 2 grupos principales según el sitio de aplicación de MSC: (1) defectos orales y maxilofaciales, y (2) defectos óseos largos^(52,55).

Defectos orales y maxilofaciales

En la cirugía oral y maxilofacial, la colocación de implantes en un enfoque reconstructivo es un procedimiento quirúrgico de rutina, pero no siempre se ha asociado con resultados satisfactorios, esto se debe a que intervienen diferentes variables, pero uno de los más importantes es la condición ósea, como la falta de hueso cortical, baja densidad del hueso esponjoso, volumen limitado y las propiedades mecánicas del hueso reabsorbido. Existen diversos tratamientos quirúrgicos para mejorar estas condiciones como la elevación de los senos maxilares con el fin de aumentar la cantidad de volumen óseo en el área molar y premolar. Entre las diversas técnicas que están disponibles para reconstruir el hueso alveolar deficiente o aumentar los rebordes óseos, como el uso de un sustituto óseo sintético como cerámica, bioglass y compuestos vitrocerámicos, el injerto autólogo sigue siendo un abordaje quirúrgico predecible y bien documentado, sin embargo, el riesgo que implica un segundo sitio quirúrgico donador limita su uso. En las últimas décadas, la aplicación de las MSC para el tratamiento de defectos óseos orales y craneofaciales se ha vuelto cada vez más popular en la literatura, a pesar de ello presentan algunos inconvenientes que deben reconocerse. En primer lugar, la extracción de médula ósea es un procedimiento doloroso y el rendimiento de la cosecha celular también es un problema. Por otro lado, una amplificación *in vitro* para las MSC recolectadas es una necesidad debido al número relativamente bajo de células. Por estos inconvenientes, algunas publicaciones han presentado MSC aisladas de tejido adiposo como una alternativa atractiva para BMSCs. Aunque las ADMSC comparten ciertas características con las BMSC (expresión de marcadores de superficie de células del tejido conjuntivo), su potencial osteogénico se ha demostrado principalmente mediante análisis *in vitro* y, a menudo, con la ayuda de factores de crecimiento como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP). No obstante, no hay evidencia rigurosa de que las MSC aisladas del tejido adiposo sean inherentemente osteogénicas^(54,55).

Defectos óseos largos

En la literatura reciente que hablan de ensayos clínicos en regeneración y reparación de huesos largos, proporciona evidencia muy limitada de datos confiables sobre la

regeneración de tejido óseo reportados después del cultivo *in vitro* de MSC. Ahman Oryan et.al. realizaron una revisión de la literatura, donde describe que los ensayos clínicos que se han reportado fueron por el año de 1986 por Conolly Shidell, el cual menciona que utilizó MSC derivadas de la médula ósea en un caso de fractura de no unión, además de que en un informe entre 1985-1995 el trasplante se usó para la osteogénesis imperfecta en 100 pacientes con fracturas tibiales, con una correlación positiva aparentemente en 80 pacientes. En la misma revisión, se reporta que en 1999 Horwitz *et.al* informaron la respuesta clínica de 3 niños con osteogénesis imperfecta grave, los cuales se sometieron a un trasplante alogénico de médula ósea, las células se inyectaron por vía intravenosa después de tratamientos con fármaco inmunosupresores y por medio de un análisis histológico y densitometría ósea mostrando una mejora significativa en la estructura ósea. A pesar de la gran cantidad de ensayos clínicos con terapia celular MSC para la regeneración ósea, el uso de estas células a través de diferentes procedimientos como la inyección directa, implantación de MSC con andamios o con matrices, codificación de células con factores de crecimiento osteoinductivos o cocultivo con otros tipos de células, y suministro de células dentro de un entorno dinámico 3D. Sin embargo, sigue siendo controvertido debido a que muchos de estos ensayos pueden reflejar 1) falta de resultados esperados 2) Inconsistencia en los resultados 3) La necesidad de realizar fases adicionales de estudio y 4) Otras razones desconocidas⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾.

3.3 Células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental (DPSC)

El tejido de pulpa dental es un tejido suave de origen ectomesenquimal y mesenquimal desarrollado de la papila dental. Existen diferentes poblaciones celulares con características de troncalidad de diversas regiones orales y maxilofaciales, pero ocho poblaciones celulares específicas que provienen de las células troncales mesenquimales (MSC) que son: Células Troncales de Dientes Deciduos Exfoliados Humanos (SHED por sus siglas en inglés), Células troncales del Ligamento Periodontal (PDLSCs por sus siglas en inglés), Células Progenitoras del Folículo Dental (DFPC, por sus siglas en inglés), Células Troncales Mesenquimales Derivadas del Hueso Alveolar (ABMSCs, por sus siglas en inglés), Células Troncales Derivada de la parte Apical de la Papila Dental Humana (SCAP, por sus siglas en inglés), Células Progenitoras de Germen Dental (TGPC, por sus siglas en inglés), y Células Troncales Mesenquimales Gingivales (GMSCs, por sus siglas en inglés)(figura 4) ⁽⁵⁸⁾.

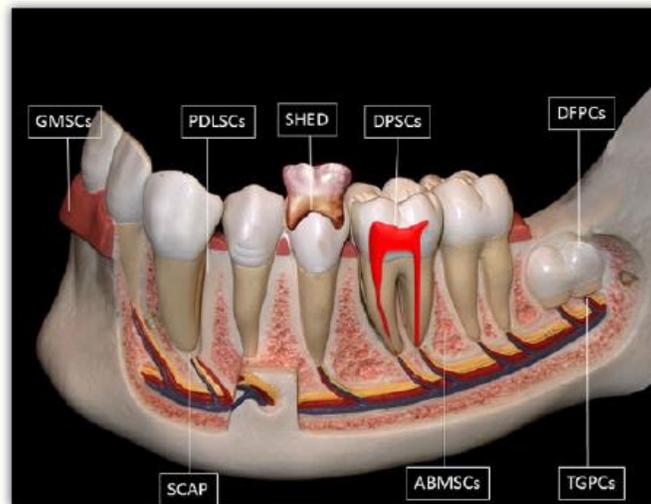


Figura 4. Ilustraciones de las diversas fuentes de MSC derivadas de tejido dental humano. Imagen tomada de Chalisserry et. al ⁽⁵⁸⁾.

Byung-Chul et al. mencionan en una revisión sobre la aplicación celular en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, que las células troncales derivadas de pulpa dental fueron las primeras células caracterizadas y aisladas en la cavidad oral por Gronthos y colaboradores en el año 2000. Su aislamiento se llevó a cabo mediante digestión enzimática, en terceros molares humanos. Por otro lado, estas células multipotenciales

presentan una morfología similar a la de los fibroblastos, y al cultivarlas en diversos medios de diferenciación tienen el potencial de diferenciarse en odontoblastos, osteoblastos, células adipogénicas, neurogénicas, condrogénicas y miogénicas⁽⁵⁹⁾ figura 5.

Multiple differentiation potential of DPSC

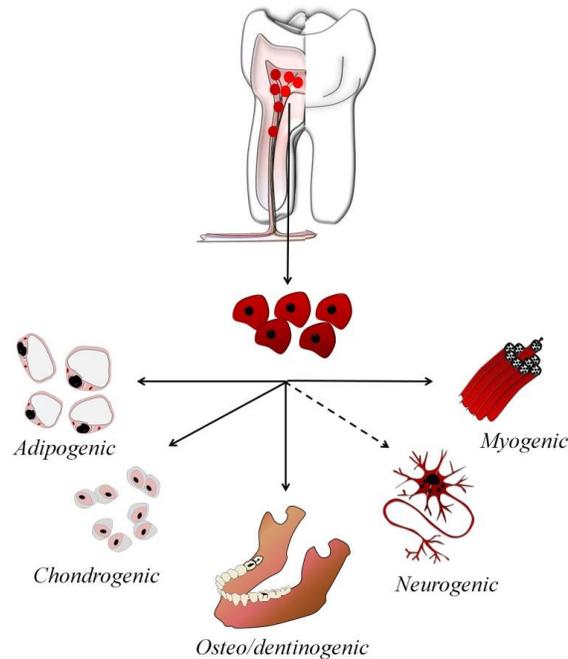


Figura 5. Potencial de la múltiple diferenciación de DPSC. Imagen tomada de Drug et. al ⁽⁵⁷⁾ .

Aunque no hay un biomarcador específico disponible para la identificación de DPSC, estas células expresan varios marcadores, incluidos los marcadores de células troncales mesenquimales y de médula ósea, STRO-1 y CD146, así como las células troncales embrionarias (ESC) como OCT4. Los marcadores de membrana más estudiados para DPSCs incluyen STRO-1, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 y CD271. Otra característica importante de las DPSC es que expresan marcadores epiteliales y comparten características comunes con las células troncales neurales, por lo que son capaces de diferenciarse *in vitro* en células troncales neurales o vasculares^(60,61).

Las DPSC y las células endoteliales tienen efecto sinérgico en co-cultivos, mejorando la diferenciación a los fenotipos osteogénicos, odontogénicos y angiogénicos. Las DPSC que crecen por el método de cultivo de explantes tienen mejor capacidad proliferativa y también se diferencian en varios tipos de células de linajes osteogénicos, adipogénicos y miogénicos. Estos cultivos tienen células troncales de cresta neural multipotente (NCSC,

por sus siglas en inglés) que pueden diferenciarse en varios linajes de células derivadas de la cresta neural, incluidos los melanocitos⁽⁶¹⁾.

Por otro lado, existen varios estudios de las DPSC que han mostrado que pueden y producir un alto volumen de matriz mineralizada, lo que sugiere que estas células también son prometedoras para su uso en tratamientos en regeneración ósea y dental^(58,60).

3.4 DPSC y regeneración ósea

Estudios recientes, *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las DPSC pueden diferenciarse fácilmente a células de linaje óseo, debido a que proporcionan factores osteoinductivos como son Proteínas Morfogénicas Óseas (BMP), además de marcadores de superficie y proteínas asociadas con la formación de tejido mineralizado (fosfatos alcalinos, osteocalcina y osteopontina). Se ha descubierto que una población de células productoras de hueso del estroma (PAS) recolectada del tejido de la pulpa dental, podría diferenciarse en células precursoras de osteoblastos que expresan CD44 +, factor de transcripción relacionado con Runt 2 (RUNX-2) y posteriormente diferenciarse en osteocitos / osteoblastos, cuando se evaluó el tejido óseo fibroso nuevo, estaba compuesto de matriz densamente mineralizada después de 50 días de cultivo *in vitro*. Además, se informó la formación de tejido óseo laminar con osteocitos post-trasplante en ratas inmunocomprometidas⁽⁶²⁾.

Por otro lado, en cultivo celular la diferenciación osteogénica de DPSC se induce fácilmente agregando ácido ascórbico (Asc), dexametasona (Dexa) y β -glicerofosfato (β -gly) al medio de cultivo, junto con suero bovino fetal. Donde el Asc es un cofactor de enzimas esenciales para generar pro-colágeno, que es necesario para la correcta síntesis del colágeno tipo I, el principal componente orgánico de la matriz ósea, Dexa es necesaria para la diferenciación de osteoblastos, que funciona como inductor de Runx2 mediante la activación de la señalización WNT / β -catenina en MSC. La expresión del factor de transcripción Runx2 es fundamental para impulsar el compromiso celular con linajes osteogénicos. Finalmente, β -gly es un donante de fosfato inorgánico, que es esencial para la creación de mineral de hidroxiapatita, y como una molécula de señalización para inducir la osteo-diferenciación DPSC⁽⁵⁹⁾.

En los últimos años, el uso de DPSC para la regeneración ósea *in vivo* por ingeniería de tejidos se ha estudiado exhaustivamente basándose en estos protocolos y utilizando

diferentes modelos experimentales y tipos de andamios con diferentes resultados. Las DPSC humana (hDPSC) son capaces de inducir la generación de tejido óseo adulto con un suministro de sangre, cuando se trasplantan en animales inmunocomprometidos (IC). Sin embargo, el uso de materiales de andamios a menudo es necesario para optimizar la estructura 3D del tejido óseo formado y mejorar la diferenciación osteoblástica de hDPSC. Para este fin, se han empleado con éxito diferentes materiales como vehículo de hDPSC, incluidos los andamios de gelatina 3D, hidrogeles de nanofibras peptídicos biodegradables autoensamblados, CaP / PLGA (calcio), andamios (fosfato / ácido poliláctico-co-glicólico), andamios de partículas de hidroxiapatita / fosfato tricálcico (HA / TCP), naturales como biocoral y quitosano / colágeno^(59,63,64).

4.- Biopolímeros

Los tratamientos actuales en el área de ingeniería de tejidos y ortopedia se basan en el uso de autoinjertos, aloinjertos e implantes de metal y plástico. Los implantes de metal y plástico sufren una variedad de desafíos, como baja fatiga, fluencia, mala adhesión y problemas de biocompatibilidad con el tejido nativo. Por lo tanto, se han desarrollado polímeros biocompatibles y biodegradables de origen sintético o artificial. Los poliésteres alifáticos, también conocidos como poli (α -hidroxi ésteres), son uno de esos grupos de polímeros bioreabsorbibles y biocompatibles que tienen un gran potencial para el uso en la regeneración de tejidos grandes. Esta clase de polímeros incluye: poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL), poli (dioxanona) (PDO) y policarbonato de trimetileno (PTMC). Dentro de este grupo, el PLA posee quiralidad que permite que los residuos de la cadena media existan en tres estados enantioméricos, L-láctico, D-láctico y meso-láctico. De estos, los polilácticos más utilizados son el poli (L-láctico) (PLLA) y el poli (D-láctico) (PDLA), respectivamente^(65,66).

4.1 Poliacido láctico

El poliacido láctico es un poliéster alifático, derivado de superficies renovables como azúcar de maíz, papa y la caña de azúcar. El uso de PLA se limitó inicialmente a aplicaciones médicas debido a su alto costo y baja disponibilidad, pero el PLA de peso molecular alto (Mw), ahora se puede procesar mediante moldeo por inyección, extrusión de láminas y películas, moldeo por soplado, formación de espuma, etc. Además, el PLA proporciona propiedades ópticas, mecánicas, térmicas y de barrera comparables en comparación con

los polímeros comerciales disponibles, como el polipropileno (PP), el poli (tereftalato de etileno) (PET) y el poliestireno (PS), ampliando su gama comercial de aplicaciones. En el campo médico, el PLA se usa ampliamente debido a su biocompatibilidad con el cuerpo humano, incluso para aplicaciones como implantes médicos, suturas quirúrgicas y dispositivos médicos⁽⁶⁷⁾.

El PLA es considerado como un material seguro en el área médica por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA). Sin embargo, el PLA también tiene algunas limitaciones (p. Ej., Poca tenacidad), por lo que los esfuerzos de investigación se centran en obtener productos de PLA con propiedades particulares deseadas al mezclar el PLA con otras resinas biodegradables y no biodegradables, o al combinar el PLA con rellenos como fibras o micro y nanopartículas^(67,68).

Características del PLA

El PLLA es un polímero semicristalino de cristalización lenta con valores de cristalinidad (40% a 50%), de fusión entre 55-80 ° C y temperatura de transición vítrea que oscilan, 170-180 ° C. Del mismo modo, el PDLA, que también es un polímero semicristalino, tiene valores de cristalinidad, fusión y temperatura de transición vítrea que van del 30% al 45%, 40–50 ° C y 120–150 ° C, respectivamente. Tanto PLLA como PDLA tienen una resistencia a la tracción comparable (4–8 GPa), alargamiento a la rotura (1–8%) y valores de resistencia a la tracción (40–70 MPa). Su naturaleza de cristalización lenta predispone a que estos materiales sean típicamente duros y quebradizos. La capacidad de cristalización de estos materiales se puede mejorar mediante procesamiento por recocido isotérmico, copolimerización, nucleación por aditivos y cristalización inducida por deformación⁽⁶⁸⁾.

La distribución aleatoria de PLLA y PDLA causa la interrupción de la regularidad estereoscópica, lo que lleva a un PDLLA poli (D, L-láctico) amorfo. La alteración de la regularidad estereoscópica de los isómeros (PDLLA) también es una forma de manipular la velocidad de degradación de este polímero. Los estudios *in vivo* han demostrado que la PLLA altamente cristalina se degrada completamente en 2 a 5 años, mientras que la mayoría de las PDLLA amorfos pierden fuerza en menos de 2 meses y se degradan completamente en 12 meses. Por otro lado, la degradación del poliácido láctico se lleva a cabo por hidrólisis que se lleva a cabo en los riñones y pulmones, los productos de degradación son el ácido láctico, CO₂ y agua todos ellos componentes naturales del cuerpo humano^(20,69)

III- Justificación

En la actualidad, los tratamientos de defectos óseos se basan en el uso de injertos (autoinjertos, xenoinjertos, aloplásticos) los cuales sirven como matriz de soporte, de relleno y/o estabilizadores; sin embargo, carecen de una estructura procesable tanto en forma como en su porosidad, aunado a que el volumen del tejido regenerado es insuficiente debido a las fuerzas mecánicas (xenoinjertos y aloplásticos). Asimismo, los autoinjertos pueden soportar dichas fuerzas mecánicas, pero su desventaja es su limitada disponibilidad. Por otro lado, estas estrategias metodológicas, son incapaces de generar estructuras que se conformen y adapten con mayor precisión al tipo de defecto óseo, siendo un reto significativo en las regiones craneofaciales por su tamaño.

En comparación con las anteriores estrategias metodológicas, la tecnología de impresión tridimensional (3D) ha surgido como un proceso que puede controlar con precisión la arquitectura del constructo a escala micro- y nanométrica a través del tamaño del poro. Por lo que su éxito está relacionado en tratar de imitar las características morfológicas de la matriz extracelular nativa (MEC). Dando pauta a nuevas investigaciones que nos permitan optimizar los constructos o prototipos impresos aditivamente capa por capa en 3D, con resultados regenerativos que puedan optimizar las terapias personalizadas.

IV.- Planteamiento del problema

Considerando lo anterior, proponemos en este trabajo de investigación generar andamios individualizados a partir de imágenes microtomográficas adquiridas de defectos de tamaño crítico de calvarias de ratas *Wistar* para diseñar y sintetizar por bioimpresión 3D los constructos con geometrías exactas al defecto y con arquitecturas micro y nano porosas interconectadas que imiten la MEC ósea, que permita la colonización por parte de las células DPSC con la finalidad de regenerar la zona del defecto de una manera eficaz, con la calidad y cantidad de tejido de *novo* similar al hueso nativo.

Pregunta de Investigación

¿Es posible sintetizar y diseñar constructos impresos en 3D individualizados tanto en forma, tamaño y espesor a partir de imágenes microtomográficas adquiridas de defectos de tamaño crítico de calvarias de ratas *Wistar*?

V.-Hipótesis

Los constructos impresos en 3D, con microarquitectura y geometría exacta a defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas *Wistar*, sembrados con células DPSC, modulan la regeneración ósea.

VI- Objetivos

Objetivo General

Diseñar y sintetizar constructos individualizados por impresión 3D a partir de imágenes microtomográficas para la regeneración de defectos de tamaño crítico de calvaria de rata *Wistar*.

Objetivos Específicos

1. Diseñar constructos a partir de imágenes adquiridas de μ CT de defectos de tamaño crítico en calvaria de ratas *Wistar*, que se ajusten al tamaño y forma del mismo.
3. Sintetizar los constructos en 3D por la técnica de extrusión aditiva de capa por capa utilizando el polímero PLA.
4. Evaluar la respuesta de viabilidad de las células DPSC en los constructos impresos 3D de PLA.
5. Implantar el constructo impreso 3D de PLA en el modelo de regeneración ósea *in vivo*.
6. Evaluar la DMO de tejido *novo* a partir de imágenes por μ CT

VI.- Metodología y diseño

Tipo de estudio	Experimental y prospectivo
Universo de estudio <i>in vitro</i>	50 andamios impresos en 3D con porosidad 30 andamios de PLA sin porosidad Células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental (DPSC).
Criterios de inclusión <i>in vitro</i>	Andamios impresos en 3D de PLA con los mismos parámetros de impresión, que mantengan su forma y superficie con porosidad homogénea.
Criterios de exclusión <i>in vitro</i>	Andamios impresos en 3D de PLA que no cumplan los requerimientos de tamaño, forma o que el PLA se haya quemado.
Universo de estudio <i>in vivo</i>	15 ratas macho cepa <i>Wistar</i> con 18 semanas de edad con 250g de peso.
Criterios de inclusión <i>in vivo</i>	Ratas macho cepa <i>Wistar</i> que cumplan con la edad, peso y sexo.
Criterios de exclusión <i>in vivo</i>	Ratas que no cumplan con los criterios de selección (edad, peso y sexo).
Criterios de eliminación <i>in vivo</i>	Ratas que presenten alguna enfermedad ajena al procedimiento quirúrgico y al andamio.

Variables <i>in vitro</i>	Definición operacional	Escala de medición
Andamio de PLA impreso en 3D	Constructo impreso en 3D con porosidad homogénea	Cualitativa, nominal
Andamio de PLA liso	Constructo de PLA	Cualitativa, nominal

Variables <i>in vivo</i>	Definición operacional	Escala de medición
Grupo control	Defecto óseo en la calvaria de rata <i>Wistar</i> , sin implantar ningún constructo	Cualitativa, nominal
Grupo experimental con DPSC	Defecto óseo en calvaria de rata <i>Wistar</i> , sin células DPSC	Cualitativa, nominal
Grupo experimental sin DPSC	Defecto óseo en calvaria de rata <i>Wistar</i> , con células DPSC sembradas previamente en el andamio	Cualitativa, nominal

A) Procedimiento quirúrgico de defecto crítico en calvaria de rata *Wistar*

Para realizar el diseño del andamio, previamente se realizó un procedimiento quirúrgico de defecto crítico (9 mm de diámetro) en la calvaria de una rata macho cepa *Wistar* de 18 semanas con 250 g de peso, el procedimiento quirúrgico se realizó de acuerdo con lo establecido por el comité de ética de la Facultad de Odontología aprobado con número CIE/10/01/2015 y la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO1999.

Se tranquilizó y sedó al animal por vía intramuscular con Ketamina (80 mg/kg) y Xilacina (10mg/kg). 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 realizar el defecto de tamaño crítico se utilizó una trefina con diámetro de 8 mm de diámetro interno (para que el defecto quedara de 9), montado en un motor para implantes a 4,000 rpm, se delimito 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 (figura 6).

Finalmente, se afrontó el tejido suturando de manera continua con ácido poliglicólico 4-0, se realizó un seguimiento clínico posquirúrgico, valorando una serie de parámetros clínicos: estado general del animal, aspecto de la herida y de la zona intervenida, sangrado y exudado. La rata permaneció en condiciones de fotoperiodo de 12 horas y una humedad relativa al 50% y se alimentó con rodent diet 5001 ad libitum.

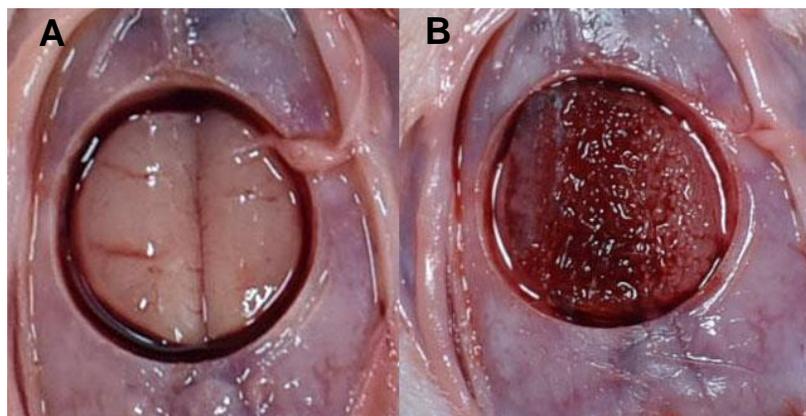


Figura 6. Defecto de tamaño crítico en la zona calvaria de la rata. A) Defecto óseo de tamaño crítico. B) Implantación del andamio de PLA en el defecto. Fuente propia

B) Diseño e impresión del andamio

A la rata con el defecto de tamaño crítico en la calvaria se le tomó un estudio de imagen por microtomografía computarizada (μ CT) con el equipo μ PET/SPECT/CT Albira ARS, Oncovisión, en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), con dicho equipo se obtuvieron diferentes imágenes DICOM (Digital Imaging and Communication in Medicine, por sus siglas en inglés).

Las imágenes DICOM fueron transformadas a formato STL (standard tessellation language, por sus siglas en inglés), por medio del software InVesalius[®] el cual es un software médico que reconstruye imágenes 3D de resonancias magnéticas y tomografías computarizadas.

Posteriormente se modeló el andamio acorde al tamaño del defecto, forma (concauidad y convexidad) y geometría, utilizando el software 3D Builder[®], permitiendo diseñar el andamio a través de la combinación de formas geométricas. Finalmente, para diseñar la parte interna del andamio se utilizó el software Slic3r[®] el cual permite traducir los modelos digitales 3D a instrucciones mecánicas en la impresora 3D.

C) Impresión del andamio

La impresora 3D (MakerMex) que se utilizó se fundamenta en la técnica de deposición fundida (FDM) con extrusión capa por capa, la punta de extrusión tiene un diámetro de 200 micras y se elevó la temperatura a 210°C para fundir el filamento del ácido poliláctico (PLA) de 1Kg de 2.85 mm de diámetro que va solidificando conforme entra en contacto con el ambiente y la cama de impresión.

Una vez que se imprimieron los andamios, se esterilizaron por plasma de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por medio de un equipo STERRAD en el Instituto Nacional de Cancerología. Previamente fueron empaquetados en bolsas de polipropileno de alta densidad (bolsas Tybek[®]) el procedimiento de esterilización se llevó a cabo en un ciclo de 54 min a una temperatura de 50° C.

D) Cultivo celular

Se cultivaron y expandieron células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental (DPSC), previamente caracterizadas en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. Se usó medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos penicilina (100 UI/ml),

estreptomycin (100 µg/ml) y fungisona (0.3 µg/ml). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C, en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ en un ambiente con 100% de humedad.

E) Ensayo de viabilidad

Para evaluar la viabilidad de los constructos impresos en 3D, se formaron dos grupos, el control, que consistió en constructos de PLA lisos y el experimental en constructos impresos en 3D. Ambos grupos sembrados con las células DPSC a una densidad de 2×10^4 células/ml posteriormente, se realizaron ensayos de viabilidad por medio de WST-1, el cual se fundamenta en la transformación de la sal de tretazolio WST-1(4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) a formazán por medio de la enzima mitocondrial deshidrogenasa, la actividad de la enzima incrementa la cantidad del colorante de formazán el cual es directamente relacionado al número de células con actividad metabólica.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado durante 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días con 0.3 mg/ml de WST-1 en un plato de 48 pozos, se incubaron por 4h, y pasando este tiempo se analizó en un lector de ELISA (Chromate, Awareness) donde se obtuvo la densidad óptica a una longitud de onda de 450 nm para correlacionar el valor con la actividad metabólica de las células vivas.

El medio de cultivo se cambió cada dos días por medio fresco, durante el experimento.

F) Procedimiento quirúrgico de defecto de tamaño crítico en calvaria de rata *Wistar* del grupo control y de los grupos experimentales

Una vez que se comprobó que el andamio de PLA no fue citotóxico para las células DPSC, se continuó con el procedimiento quirúrgico de defecto de tamaño crítico en la zona de la calvaria en 15 ratas macho cepa *Wistar* de 18 semanas con 250 g de peso, las cuales se asignaron aleatoriamente a tres grupos de 5 ratas cada uno; 1) control, solo defecto, 2) andamio impreso en 3D de PLA y 3) andamio impreso en 3D de PLA con células DPSC. Se realizó el mismo procedimiento quirúrgico descrito anteriormente en el inciso A).

G) Evaluación de los andamios de PLA implantados por medio de microtomografía computarizada (µCT)

Para evaluar la calidad y cantidad de tejido óseo neoformado, se adquirieron imágenes de µCT de los animales a diferentes periodos de tiempo posterior a la implantación del

constructo 3D de PLA (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 45 Kilovoltios (kV) y 1000 proyecciones para obtener imágenes de alta resolución (CT-High-Res. HD-HV).

Para calcular la DMO, se realizaron ROIS de 2.17 mm en las imágenes microtomográficas, tomando en cuenta 3 zonas de interés (Hueso nativo, andamio y tejido *novo*), posteriormente se compararon los resultados analizando las concentraciones conocidas de hidroxiapatita con la finalidad de conocer los mg de hidroxiapatita por centímetro cúbico (mgHA/cc), en los grupos experimentales.

H) Sacrificio de los animales

Al final del periodo de tiempo establecido, los animales se sacrificaron mediante sobredosis de cloroformo hasta llegar al paro cardio-respiratorio, posteriormente se realizó osteotomía para la remoción de la calota en la zona del defecto, la cual se hizo con pieza de alta rotación e irrigación con agua corriente, con un margen de seguridad de 10 mm en toda la periferia del defecto, posteriormente se lavó cuidadosamente la muestra y se sumergió en formol al 10% durante 24 horas para su fijación.

I) Análisis de resultados

Se realizaron dos análisis estadísticos, el primero para analizar la viabilidad celular de los andamios, utilizando un análisis de U de Mann-Whitney con el programa estadístico IBM SPSS statistics versión 23, con una significancia de $p= 0.05$, para tener resultados estadísticamente significativo.

Por otro lado, para la evaluación de la DMO se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía, con prueba post-hoc Tukey con una significancia de $p= 0.05$, para tener resultados estadísticamente significativo.

VIII.- Resultados

Diseño del andamio en 3D a través de imágenes microtomográfico μ CT

Se realizó un defecto de tamaño crítico en la calvaria de una rata *Wistar* de acuerdo con la metodología descrita, esta imagen se obtuvo en formato DICOM y se transformó en formato STL para crear una superficie tridimensional que puede ser modificada posteriormente por los otros softwares. En la figura 7 se observa superficie 3D en el software InVesalius[®].

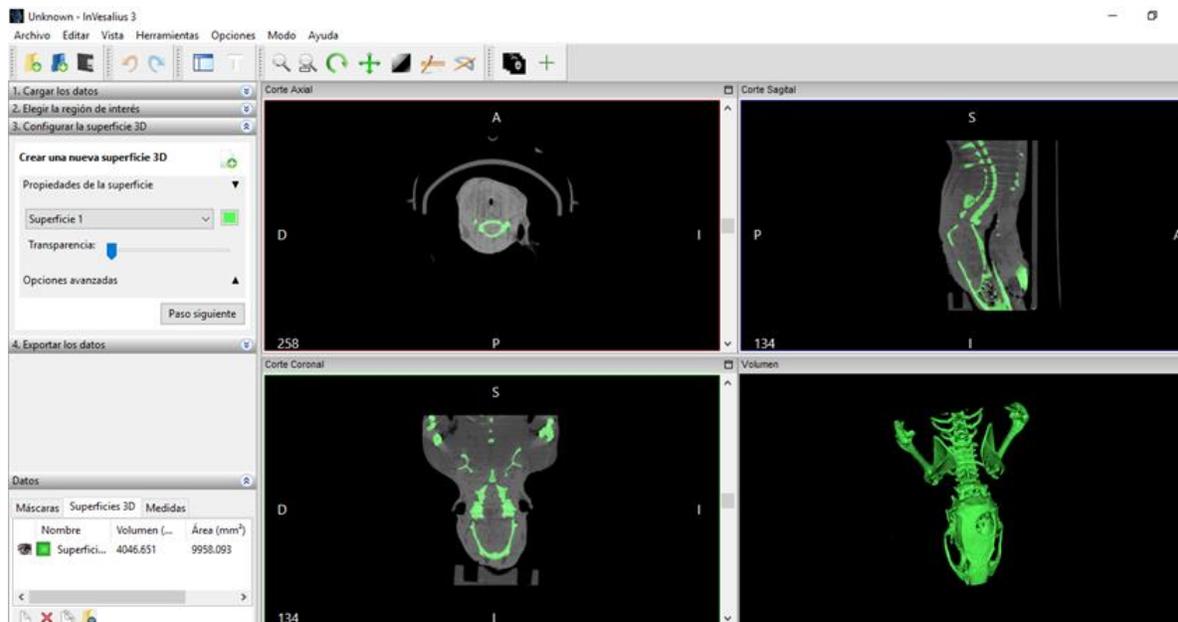


Figura 7. Imagen de defecto óseo en calvaria de rata *Wistar*, procesada para crear una superficie tridimensional en el software InVesalius[®]. Fuente propia.

Una vez creada la superficie 3D se exportó la imagen al software Builder[®], el cual permite cortar la imagen solo en el área del defecto óseo y crear el andamio al tamaño del defecto adaptando diferentes figuras geométricas, hasta formar el andamio y se ajuste al defecto en forma (concavidad y convexidad) tamaño y bordes. En la figura 8, se observan imágenes representativas del diseño del andamio.

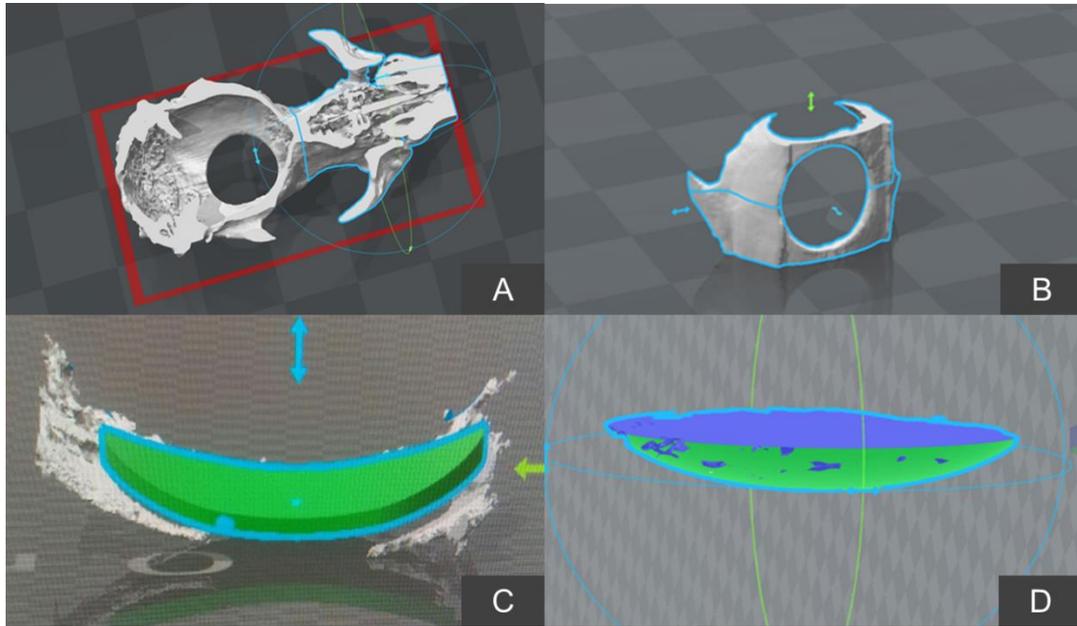


Figura 8. Diseño del andamio en el software Builder®. A) Selección de la zona del defecto. B) Eliminación del tejido sobrante. C) Adaptación del andamio al tamaño del defecto, respetando la concavidad y convexidad. D) Obtención del andamio. Fuente propia.

Se exportó la imagen obtenida del segundo software a Slic3r, en el cual se modificaron parámetros importantes como la velocidad de flujo (40-70mm/s), patrón de relleno existen varios modelos como: lineal, panal de abeja, curvilínea etc. Siendo el patrón de elección el rectilíneo, uno de los parámetros más importantes a considerarse es la densidad de relleno, el que permitió aproximar el tamaño de poro en un rango de $200\mu\text{m}$ - $250\mu\text{m}$ a una densidad de 85% y así obtener una superficie porosa homogénea. Este tamaño del poro se eligió con base en la literatura y la limitante de la resolución de la impresora 3D. La Figura 9, muestra el diseño del andamio con un patrón de relleno rectilíneo que crea una superficie porosa mediante la reticulación capa por capa, en la tecnología de modelado por deposición fundida (FDM).

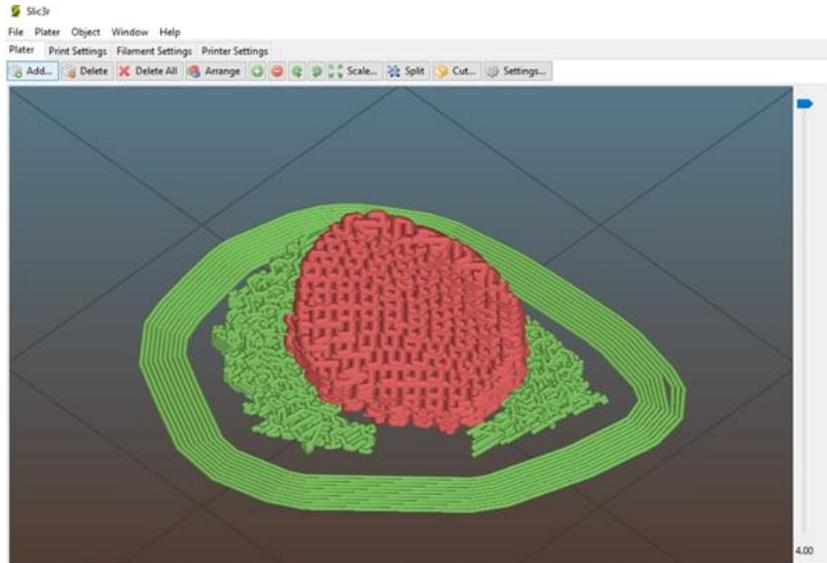


Figura 9. Diseño del andamio en el software Slic3r®. En donde se muestra un patrón de relleno rectilíneo que crea una superficie porosa mediante la reticulación capa por capa, además nos muestra el material de sacrificio el cual es de color verde. Fuente propia

Una vez que se diseñó el andamio, se imprimió en la impresora MakerMex con los parámetros establecidos por Slic3r, el andamio mide 9 mm de diámetro y un espesor de 1.90 mm (figura 10).

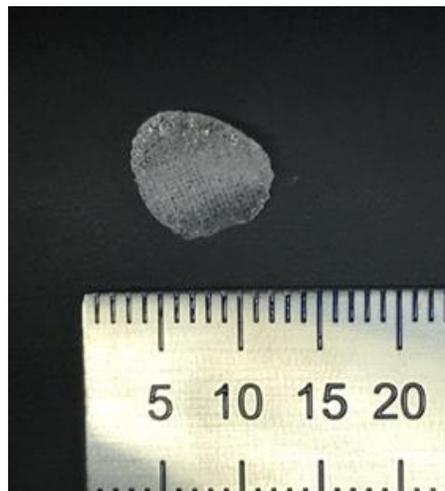


Figura 10. Andamio impreso en PLA. Fuente propia.

Caracterización superficial del andamio

Para el análisis de la superficie del andamio se tomaron imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM) en el Instituto de Física de la UNAM. Se observó que se creó una superficie porosa, debido al entrecruzamiento de las fibras de PLA y por la adición de capa por capa. Es importante mencionar que uno de los principales objetivos de un andamio es mimetizar la matriz extracelular del tejido óseo, es por ello que en la figura 11, se compara la microarquitectura de la imagen de microscopía electrónica de barrido del andamio impreso en 3D, con la matriz extracelular del hueso trabecular. Además, se midió por medio del software ImageJ, el promedio del tamaño de poro el cual fue de $214\mu\text{m}$.

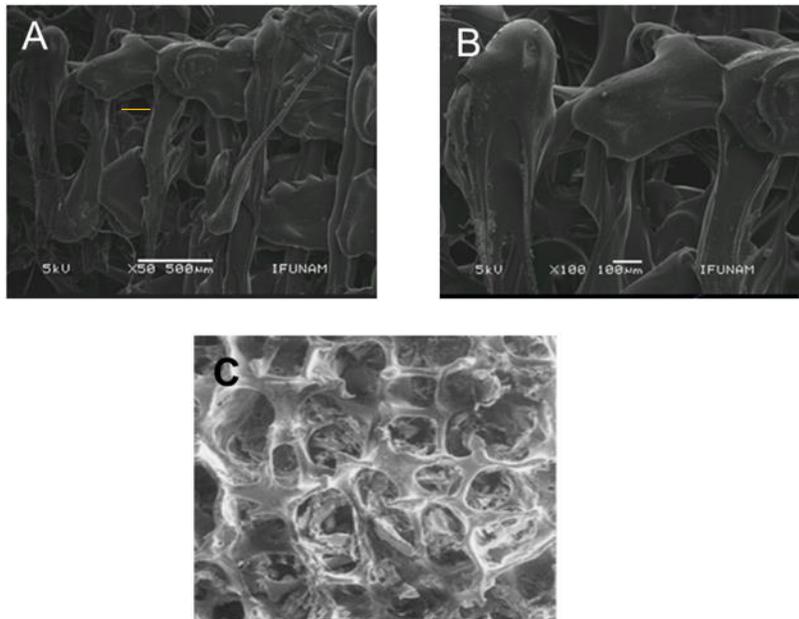


Figura 10. Micrografía en SEM del andamio impreso en 3D y de la matriz extracelular de hueso trabecular. A) Micrografía en SEM de la superficie porosa del andamio 3D a una escala $\times 50$. Línea amarilla representa la medición que se realizó del tamaño del poro por medio del software ImageJ. El promedio del tamaño del poro que fue de $214\mu\text{m}$. (fuente propia). B) Micrografía en SEM de la superficie del constructo 3D a una escala $\times 100$ (fuente propia). C) Imagen de SEM del hueso trabecular. . Martina, S.(2018). Micrografía SEM hueso cortical humano [Figura]. Recuperado de https://www.sweden-martina.com/es_es/product/implantologa_y_ciruga_oral-13444/ciruga_oral-1015/keras-2661.html.

Respuesta celular al andamio de PLA impreso en 3D

Se evaluó la respuesta de viabilidad de las células DPSC en los constructos impresos en 3D de PLA, para lo cual, se realizó el ensayo de viabilidad WST-1.

Los resultados demuestran que el grupo control, tuvo menor actividad proliferativa en comparación con el grupo experimental, a partir del tercer día, debido a que el constructo control tenía una superficie lisa, no permitió una buena adhesión celular y por lo tanto viabilidad. De igual manera se observa a los 14 días una disminución notable, sin embargo, al día 21, se observó un aumento; lo que permite intuir que en el día 14 las células empezaron a secretar matriz extracelular, lo que disminuyó su proliferación, al día 21, una vez secretada la matriz se obtuvieron las condiciones necesarias para que aumentara la población celular. En contraste el grupo experimental, mantuvo una actividad proliferativa constante en el transcurso de los días (figura 12), confirmando que hay una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos con una $p < 0.05$, por lo tanto, la microarquitectura del constructo impreso en 3D, promueve la actividad proliferativa, comprobando que no es citotóxico para células DPSC.

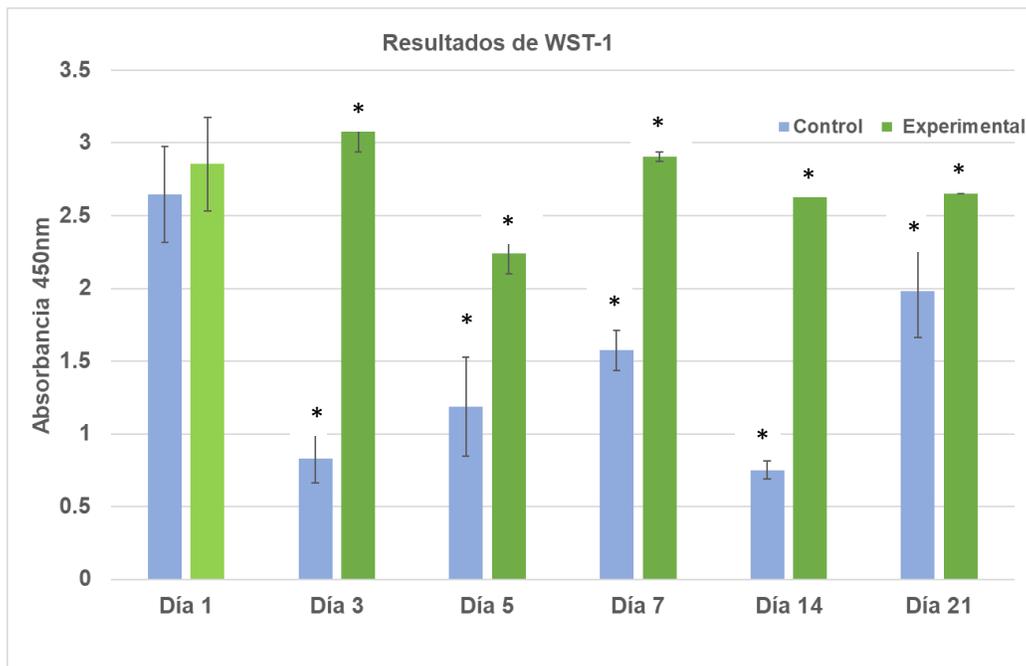


Figura 11. Gráfica de viabilidad celular, el grupo control consiste en utilizar un andamio de PLA sin porosidad sembrado con células DPSC y el grupo experimental el cual consiste en el andamio impreso en 3D sembrado con las células DPSC. El asterisco * representa diferencias estadísticas. (Fuente propia).

Respuesta del modelo óseo *in vivo*

Previo a los procedimientos quirúrgicos, los andamios se esterilizaron por plasma de peróxido de hidrógeno, debido a que es una técnica recomendada para materiales termosensibles como es el PLA.

Se realizaron los procedimientos quirúrgicos en 15 ratas *Wistar* machos, realizando el modelo de defecto de tamaño crítico en calvaria antes mencionado.

Se formaron 3 grupos de manera aleatorio con 5 ratas cada uno; el grupo control, consistió en la realización únicamente del defecto óseo, el primer grupo experimental consistió en realizar el defecto óseo e implantar únicamente el constructo 3D, y el segundo grupo experimental consistió en implantar el constructo 3D con las células DPSC en el defecto de tamaño crítico. Se evaluaron las imágenes tomadas del microtomógrafo a diferentes días (8, 30, 60 y 90 días).

En la figura 13 se puede observar una serie de imágenes de microtomografía, donde se observa en el grupo control, que con el transcurso del tiempo no hay evidencias de regeneración de la zona, lo que confirma que es un defecto de tamaño crítico.

En el grupo experimental, donde se encuentra únicamente el andamio se observa que los bordes están perfectamente sellados y a los 90 días existe la presencia de zonas radiodensas en los bordes.

En el grupo experimental con células, se observa que el andamio se adapta a los bordes y comienza la formación de zonas radiodensas a partir de los 30 días, siendo más evidente a los 90, tanto en la periferia como en el centro del defecto.

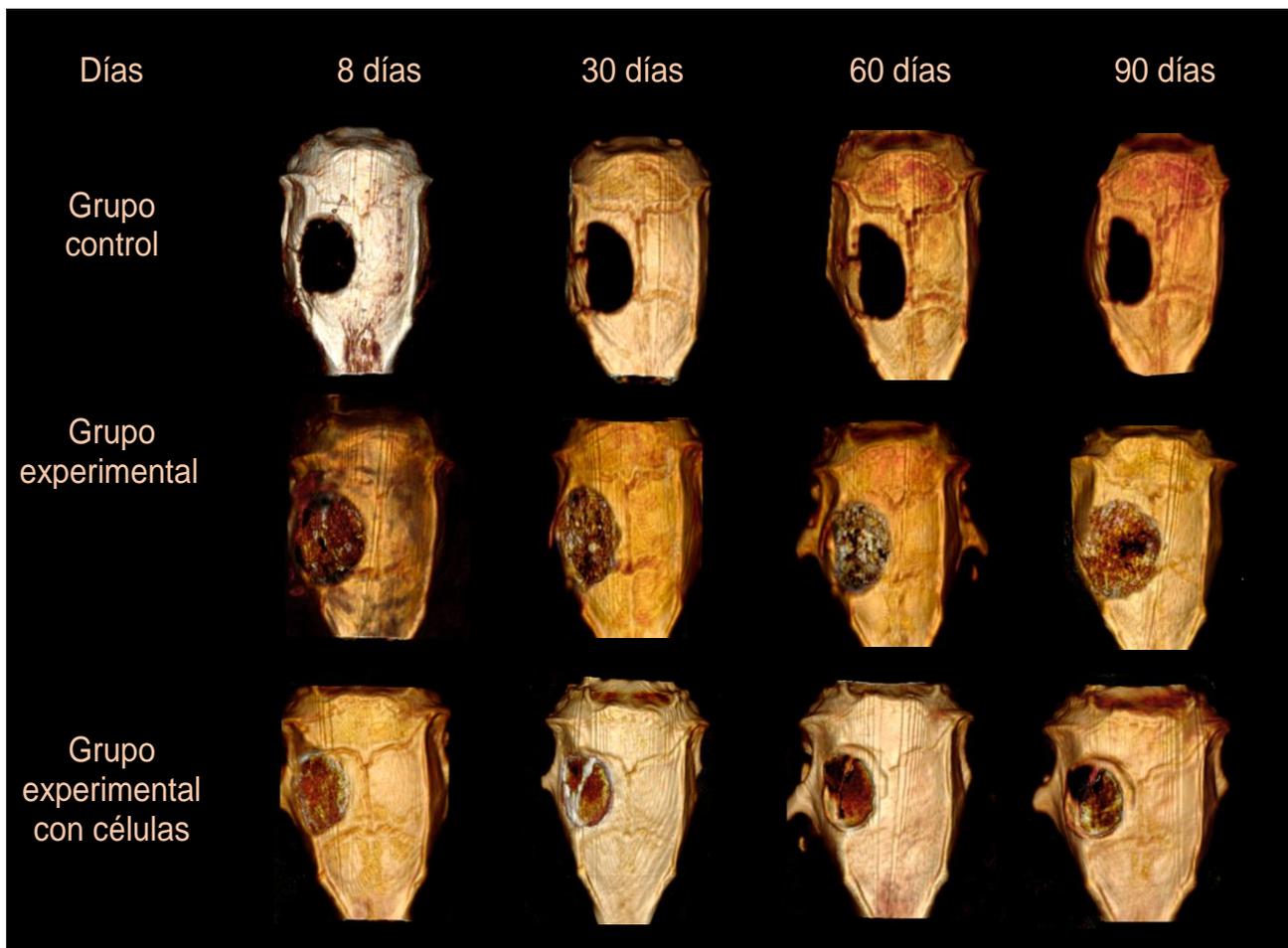


Figura 13. Imágenes representativas de los dos grupos experimentales y el grupo control a diferentes tiempos. Fuente propia.

Para evaluar las características de las zonas radiodensas, se midió la Densidad Mineral Ósea (DMO) en tres zonas de interés: Hueso nativo, andamio y tejido *novo*, únicamente de los grupos experimentales, donde las abreviaciones “Exp” corresponde al grupo de constructo impreso 3D sin células y la abreviatura “Cel” representa al grupo de constructos impresos 3D con células DPSC; el grupo control no fue evaluado porque no presenta regeneración de la zona de defecto.

En la figura 14 se observa la DMO a los 8 días posteriores a la cirugía, donde se comparan las diferentes zonas de interés con cada uno de los grupos, los resultados demuestran que el tejido *novo* experimental con respecto al tejido *novo* con células, su DMO es similar (40.59 y 46.48 mmHA/cc respectivamente), en comparación con el tejido nativo que presenta una mayor DMO (76.94 y 96.21mmHA/cc), ya que a los 8 días, la zona que se está regenerando

no cuenta con las características de un tejido mineralizado. Cabe señalar que existió diferencia estadísticamente significativa entre el hueso nativo de ambos grupos experimentales con un valor de $p < 0.05$.

En la figura 15 se observa que a los 30 días la DMO de la zona del tejido *novo*, en ambos grupos, aumentó (70.24 y 73.46 mmHA/cc respectivamente), sin presentar diferencia estadística. Por otro lado, el hueso nativo de ambos grupos mostró diferencia estadísticamente significativa, al igual que la zona correspondiente al andamio.

En la figura 16 se observa que, a los 60 días, la DMO del tejido *novo*, en el grupo Exp. aumentó (88.22 mmHA/cc) y en el grupo Cel. disminuyó (73.71 mmHA/cc), sin embargo, no presentó diferencia estadística. Contrastando con la zona correspondiente a hueso nativo, ya que ambos grupos presentaron diferencia estadística.

En la figura 17 se observa que a los 90 días, la DMO del tejido *novo*, disminuyó en ambos grupos (71.87 y 65.16 mmHA/cc) en comparación con los días anteriores. Cabe señalar que no hubo diferencias significativas en ninguna zona de interés entre los grupos.

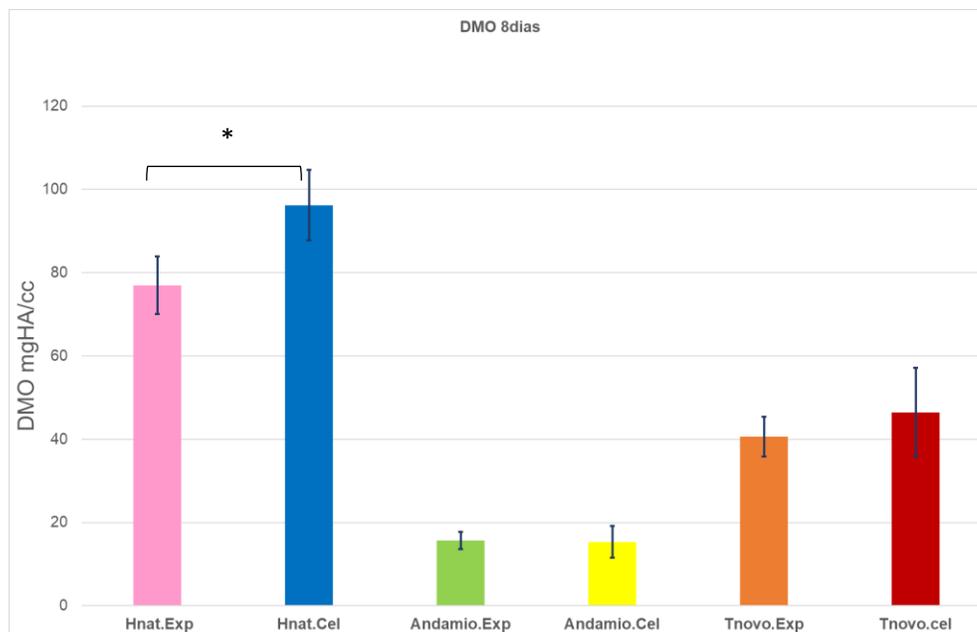


Figura 14. DMO del día 8. Se comparan la DMO de acuerdo con la cantidad de mgHA/cc de los diversos tejidos de los grupos experimentales. Hueso nativo del grupo experimental (Hnat.Exp), hueso nativo del grupo experimental con células (Hnat.Cel), andamio en el grupo experimental (Andamio. Exp), andamio con el grupo experimental con células (Andamio.Cel), tejido novo en el grupo experimental (Tnovo.Exp) y finalmente el tejido novo del grupo con células (Tnovo.cel). El asterisco *, representa diferencias estadísticamente significativas. Fuente propia.

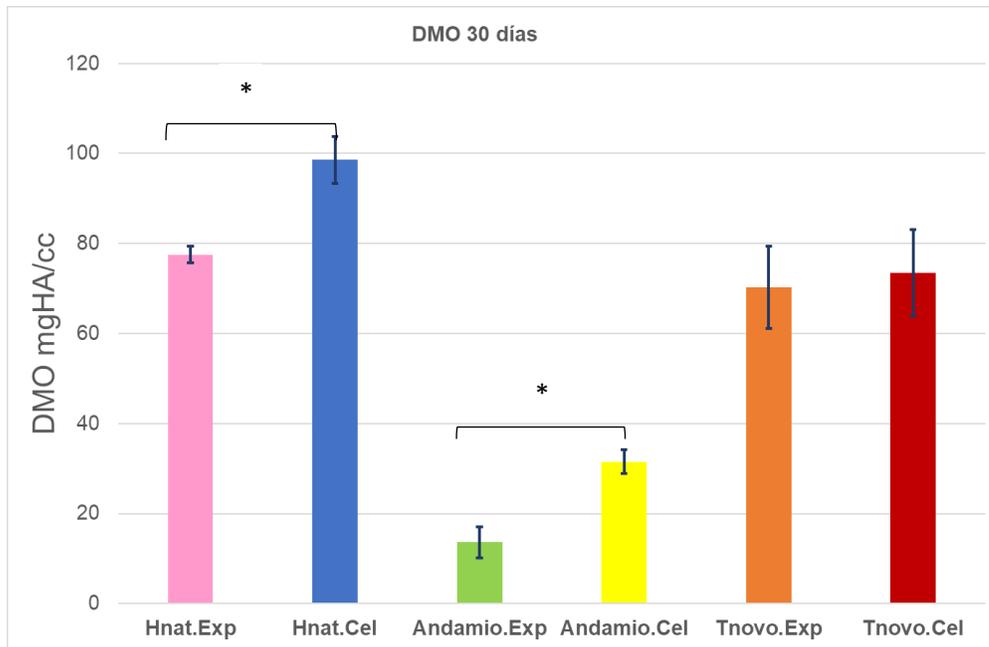


Figura 15. DMO del día 30. Se comparan la DMO de acuerdo con la cantidad de mgHA/cc de los diversos tejidos de los grupos experimentales. Hueso nativo del grupo experimental (Hnat.Exp), hueso nativo del grupo experimental con células (Hnat.Cel), andamio en el grupo experimental (Andamio. Exp), andamio con el grupo experimental con células (Andamio.Cel), tejido novo en el grupo experimental (Tnovo.Exp) y finalmente el tejido novo del grupo con células (Tnovo.cel). El asterisco * representa diferencias estadísticamente significativa. Fuente propia

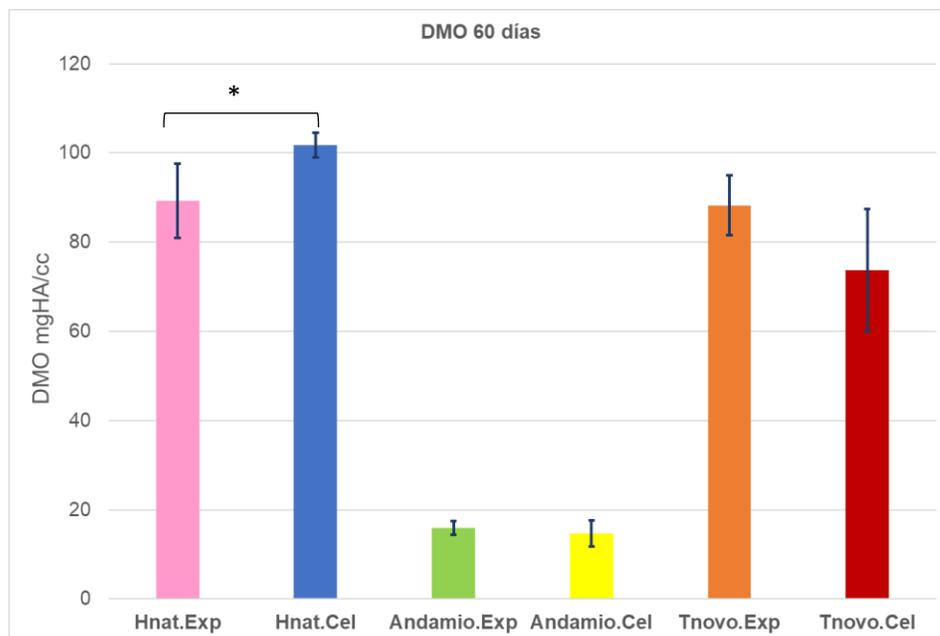


Figura 16. DMO del día 60. Se comparan la DMO de acuerdo con la cantidad de mgHA/cc de los diversos tejidos de los grupos experimentales. Hueso nativo del grupo experimental (Hnat.Exp), hueso nativo del grupo experimental con células (Hnat.Cel), andamio en el grupo experimental (Andamio. Exp), andamio con el grupo experimental con células (Andamio.Cel), tejido novo en el grupo experimental (Tnovo.Exp) y finalmente el tejido novo del grupo con células (Tnovo.cel). El asterisco * representa diferencias estadísticamente significativas. Fuente propia

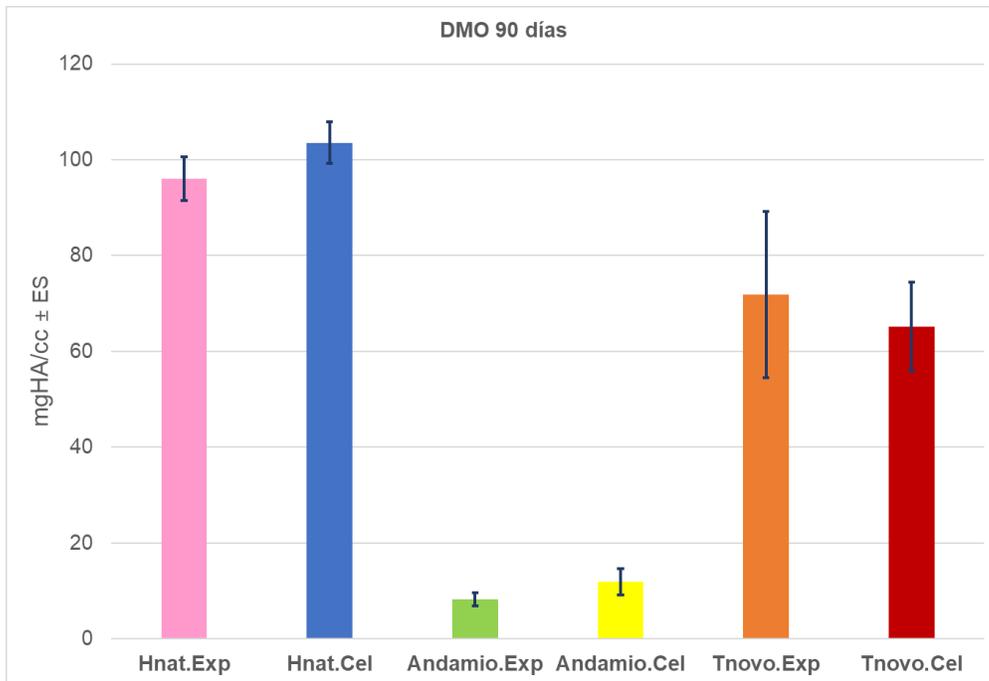


Figura 17. DMO del día 90. Se comparan la DMO de acuerdo con la cantidad de mgHA/cc de los diversos tejidos de los grupos experimentales. Hueso nativo del grupo experimental (Hnat.Exp), hueso nativo del grupo experimental con células (Hnat.Cel), andamio en el grupo experimental (Andamio. Exp), andamio con el grupo experimental con células (Andamio.Cel), tejido novo en el grupo experimental (Tnovo.Exp) y finalmente el tejido novo del grupo con células (Tnovo.cel). Fuente propia.

En la figura 18, se resumen los resultados de las mediciones de las DMO, en donde se representan las comparaciones de las tres zonas de interés (hueso nativo, andamio y tejido novo) a los diferentes días, donde se comprobó que en los tejidos nativos tanto del grupo Exp y el grupo Cel presentaron diferencias significativas entre ellos hasta el día 30, (líneas azul marino y lila respectivamente). Dichos resultados sugieren que las células DPSC migraron a la zona del tejido nativo, aumentando la DMO, en el grupo experimental del andamio con células.

Con respecto al tejido novo, entre ambos grupos experimentales (líneas azul claro y verde) no hay diferencia significativa en la DMO, adicionado que no se encontró diferencias en entre el hueso nativo y el tejido novo del grupo Exp, lo que permite comprobar que el tejido que se está formando, está en proceso de mineralización. Por otro lado, la DMO que tiene el tejido del andamio de ambos grupos no presentaron diferencias significativas entre ellos.

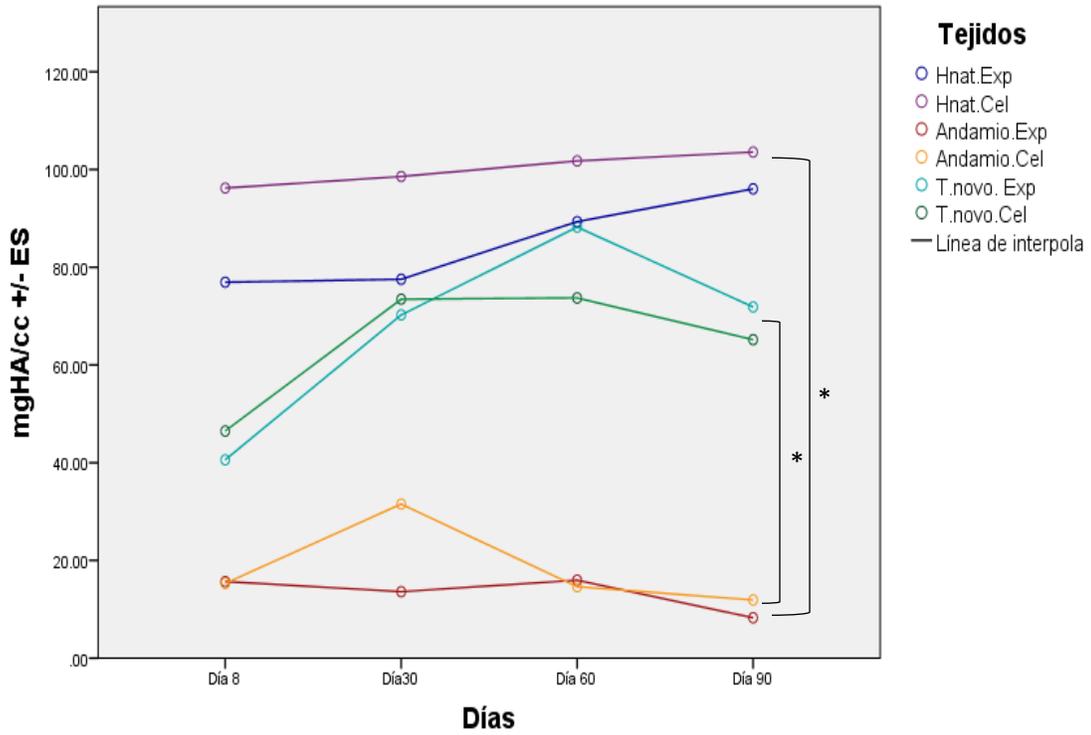


Figura 18. Comparación de la DMO de los tejidos a los diferentes días (8, 30, 60 y 90 días). El tejido nativo del grupo experimental sin células y el grupo experimental con células (Hnat.Exp y Hnat.Cel respectivamente) representados en línea color lila y azul rey. El tejido novo que se está formando en ambos grupos (Tnovo.Exp y Tnovo.Cel) representados en línea azul claro y verde. El tejido que corresponde al andamio en ambos grupos (Andamio.Exp y Andamio.Cel) representados en línea amarilla y rojo. Se representa con un asterisco * la zona donde hay diferencia significativa. Fuente propia.

IX.- Discusión

La ingeniería de tejidos, es un campo multidisciplinario, que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida para desarrollar sustitutos biológicos que regeneren, mantengan o mejoren la función de los tejidos del cuerpo humano^(37,70). A medida que progresa el campo de la ingeniería, la necesidad de crear constructos con biomateriales de primer nivel y con técnicas de fabricación reproducibles y de fácil acceso, ha adquirido un desafío primordial. Por lo que el uso de polímeros biodegradables, como el PLA se ha generalizado⁽⁷¹⁾. El PLA, ofrece un potencial importante para su uso en la ingeniería regenerativa de tejido óseo, como constructos 3D, debido a sus propiedades mecánicas, su tasa de degradación favorable, permite el diseño de estructuras porosas altamente interconectadas, su potencial para encapsular factores de crecimiento, células troncales, agentes anti-inflamatorios y facilitar la osteointegración⁽⁷²⁾. Sin embargo, existen estudios en los que se reporta que el producto de degradación del PLA, el ácido láctico, modifica el pH del ambiente celular, lo que conduce a la inflamación del tejido, además que en su superficie no presenta ningún tipo de epítomos que ayuden a promover la adhesión celular; por lo que algunos autores han optado por combinar el PLA con otros polímeros como el quitosán, para neutralizar el pH inducido por el PLA y por su característica hidrofílica que ayuda a promover la adherencia celular.⁽⁶⁸⁾ Otros autores optan por combinar el uso de otros elementos, como plasma rico en plaquetas, proteínas de adsorción, moléculas hidrofílicas inmovilizadas etc⁽⁷³⁾. En este trabajo de investigación se utilizó el PLA natural que es comercializado para su uso de impresoras 3D con la técnica de deposición fundida, donde las células DPSC se mantuvieron viables en el andamio de PLA. Es importante mencionar que el proceso de esterilización de los andamios fue a través de plasma de peróxido de hidrógeno, donde la literatura reporta que el plasma puede modificar la superficie hidrofóbica del PLA en hidrofílica, ayudando a la adhesión celular⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾. Por otro lado, en el modelo de defecto óseo *in vivo*, las ratas no mostraron proceso inflamatorio crónico provocado por el material, comprobando así que el PLA por si solo es biocompatible.

El procesamiento de constructos de PLA por diversas técnicas como lixiviación de partículas, liofilización, separación de fases, hilado de fibras y moldeo de fusión, presentan entre sus desventajas, que no se puede controlar la forma geométrica y el tamaño en la interconectividad porosa^(71,77). Recientemente, la tecnología de impresión 3D de modelado por deposición fundida (FDM), permite controlar con precisión la arquitectura y la

interconectividad porosa del constructo, cuyo desafío en el campo de la impresión 3D, es la búsqueda de modelos que permitan y faciliten el desarrollo de constructos personalizados, que cumplan con las características óptimas del defecto a regenerar⁽⁷⁸⁾. Asimismo, las características antes mencionadas funcionan como matriz extracelular (MEC), para la colonización por parte de las células troncales, que han tomado un papel crucial en la ingeniería regenerativa. En comparación con otras técnicas de impresión 3D, la técnica FDM es la que menos resolución tiene, sin embargo, la impresora que se utilizó en este proyecto (MakerMEX) tiene una resolución de 0.2 μm , lo que permitió construir el andamio con una porosidad homogénea.

En el área dental las células troncales mesenquimales derivadas de la pulpa dental (DPSC), que son fácilmente accesibles, expresan varios factores de transcripción que están implicados en el mantenimiento de la auto-renovación y presentan multipotencia bajo condiciones de cultivo definidas, diferenciándose en linajes osteogénicos, adipogénicos, condrogénicos y neurogénicos^(64,79). Por lo tanto, en este proyecto se utilizaron las células DPSC, debido a que se busca entender su respuesta en la regeneración ósea, mediada por la microarquitectura de los constructos 3D, funcionando como soporte para la infiltración celular, migración y proliferación. Debido a que todas las células dependientes de anclaje residen en una matriz extracelular (MEC), siendo el objetivo principal de un constructo, crear un entorno que imite de cerca las características de MEC natural y permita la adhesión y proliferación de células para funcionar como lo harían de manera *in vivo*.

Se sabe que las DPSC expresan marcadores relacionados con el tejido óseo, similares a los de las células troncales derivadas de médula ósea (BMSC).

Por otro lado, las DPSC, de acuerdo con el estudio de Jensen *et. al* son capaces de diferenciarse en osteoblastos, producir matriz mineralizada y estructuras trabeculares similares al tejido óseo. El objetivo principal de su estudio fue comparar los cultivos DPSC y BMSC con respecto a la proliferación, diferenciación osteogénica y la mineralización; los resultados comprobaron que las DPSC presentaron un mayor potencial osteogénico regenerativo en comparación con las BMSC tanto *in vitro* como *in vivo*⁽⁸⁰⁾. Es importante mencionar, que ambos linajes celulares fueron implantados en constructos de policaprolactona (PCL), inducidos con medio de cultivo osteogénico, por lo que se sugiere para estudios futuros diferenciar las células DPSC a linaje óseo antes de ser implantadas en modelos óseos *in vivo*.

Como ya se mencionó, las características de un andamio afectan la entrega de oxígeno, nutrientes y la eliminación de residuos, siendo una de las principales características la porosidad del andamio. El tamaño de poro es crítico para controlar tanto la extensión del tejido como la superficie interna, disponible para la unión de las células, si los poros son demasiado pequeños, son ocluidos por las células, lo que evita la penetración celular, la producción de MEC y la neovascularización en las regiones internas del andamio, si los poros son demasiado grandes, las células no reconocerán las micro-características específicas de los andamios.

Cristian *et al.*, mencionan que el tamaño del poro que favorece la adhesión celular, depende del material con lo que se fabrique el andamio, en su estudio utilizaron PLA y DPSC, donde refieren una gama de tamaño de poros que comprende entre 100-200 μm , ha mostrado un crecimiento óseo sustancial, mientras que un rango más pequeño entre 75-100 μm da como resultado la formación de un tejido osteoide no mineralizado^(72,81).

Chung *et al.*, mencionan que todavía no existe un consenso general sobre el tamaño óptimo de poro necesario para el crecimiento celular y la formación de tejido⁽⁸¹⁾. Sin embargo, otro estudio que habla sobre el tamaño de poro en los constructos para los osteoblastos se encuentra entre 100-350 μm ⁽⁸¹⁾.

Otro punto importante a discutir con respecto a la porosidad, es la gradualidad funcional que reportan varios artículos,^(78,82,83) dicho termino se refiere a constructos con porosidad graduada, donde el tamaño del poro va disminuyendo del centro a la periferia del constructo, con los objetivos de mimetizar la estructura natural del tejido óseo, crear un ambiente favorable para el crecimiento celular y como una estrategia para fomentar la irrigación sanguínea en el centro de los defectos óseos. Con respecto a la evaluación de las imágenes por μCT , de los grupos experimentales de este estudio, mostraron una formación de tejido *novo* menor en el centro del defecto óseo en comparación con los bordes, por lo que se sugiere sintetizar constructos con la gradualidad funcional, para fomentar la formación de tejido *novo* en todas las zonas del defecto.

Li *et. al* evaluaron constructos impresos en 3D con técnica de FDM los cuales fueron funcionalizados con plasma rico en plaquetas (PRP), con una porosidad homogénea, examinaron la formación de matriz ósea, *in vitro*, usando DPSC sembradas en los constructos, por otro lado, evaluaron la formación ósea *in vivo*, usando defectos de tamaño crítico en calvaria de ratas *Wistar*. Sus resultados comprueban que al controlar la

microarquitectura y la interconexión de los poros (200-300 μ m), de los constructos impresos en 3D con la técnica FDM, confirmaron que las células DPSC se adhieren y proliferan en dichos constructos, además, al realizar la evaluación *in vivo* hubo formación de tejido *novo* mineralizado⁽⁸⁴⁾. Se sugiere que estos resultados, se deben a la acción del PRP, sin embargo, en el presente estudio, comprobamos a través del ensayo *in vitro* WST-1, que el tamaño del poro en esos rangos fue adecuado. Se fabricaron los constructos con una porosidad homogénea, modificando un parámetro fundamental en el programa Slic3r, que es la densidad de relleno la cual se colocó a un 85%, lo que permitió obtener un tamaño de poro aproximado de 214 μ m, donde las células se mantuvieron viables en el transcurso de los días, permitiendo realizar los estudios en un modelo óseo *in vivo*.

Al realizar el análisis de las imágenes microtomográficas, se observó que el andamio se adaptó de manera adecuada al tamaño y forma del defecto óseo, y la densidad mineral ósea, demostró que dicho andamio, permitió el crecimiento de tejido *novo* mineralizado dentro del defecto de tamaño crítico, teniendo resultados similares entre el grupo experimental en donde se implantó el andamio sin las células DPSC, en comparación con el grupo experimental, en donde se implantó el andamio con las células DPSC.

Por otra parte, hasta los 30 días, existieron diferencias significativas en la DMO en el hueso nativo, entre ambos grupos, sin embargo, al día 90 no hubo diferencias significativas, lo que sugiere que, en los primeros días, las células pudieron haber migrado hacia la zona del hueso nativo, provocando que el tejido *novo* del grupo con células, no presentara mayor densidad mineral ósea, ya que ambos grupos no presentan diferencia significativa. Considerando otro enfoque, se sugiere que el proceso de diferenciación de las células DPSC a linaje óseo se da en un tiempo más prolongado en comparación con las células troncales mesenquimales huésped, debido a que el linaje óseo no es su destino celular prioritario para las células DPSC, sin embargo, los resultados también nos permiten sugerir que, en un tiempo de estudio más prolongado, lograríamos observar mayor cantidad de tejido *novo* con un DMO similar al tejido nativo.

De acuerdo a los resultados, se observó que, a los 90 días la DMO en el tejido *novo* de ambos grupos disminuyó, posiblemente a que el tejido que se está formando, puede estar en proceso de remodelado óseo, el cual es un proceso fisiológico que se lleva a cabo durante la regeneración ósea; dicho proceso consiste en la reabsorción del coágulo, reemplazado por tejido de granulación, este estadio se caracteriza por una movilización celular y crecimiento vascular mediado por angipoyentinas y diferentes factores de

crecimiento endoteliales vasculares (VEGFs), además una actividad considerable de macrófagos y osteoclastos es responsable de remover y reabsorber residuos de tejidos blando y duro, para ser reemplazado gradualmente por tejido óseo^(7,85). Sin embargo, es necesario realizar estudios complementarios, como de histología e inmunología, que nos confirmen que el tejido *novo* cuenta con las características anatómicas del tejido óseo.

X.-Conclusiones

Con base a los resultados se puede concluir que:

- Es viable diseñar constructos personalizados con base en imágenes microtomográficas, los cuales pueden ser impresos con un tamaño de poro adecuado para las células DPSC.
- Los constructos impresos en 3D, son considerados biocompatibles ya que promovieron la viabilidad celular.
- El constructo impreso en 3D de manera exacta al tamaño de los defectos, permitió que no existiera una reacción adversa, ratificando su biocompatibilidad.
- El constructo impreso en 3D puede ser considerado osteoconductor, al permitir la formación de tejido *novo* en la zona del defecto.
-
- El tejido *novo*, presentó diferencia significativa en la DMO entre ambos grupos, sin embargo, no es lejana a la DMO del tejido nativo. lo que permite postular que en futuros enfoques estos constructos podrían sembrarse con células troncales, previamente inducidas a linaje óseo, permitiendo postular que se tendrá mejores resultados.

Es importante mencionar que se necesita realizar estudios moleculares para comprobar un posible proceso de diferenciación de las células DPSC al linaje óseo, además de una evaluación histológica del *tejido novo*.

XI.- Referencias

1. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology The Skeleton. Clin J Am Soc Nephrol. CJASN ,2008; 3:131–9. Doi:10.2215/CJL.04151206.
2. Florencio-Silva R, Sasso G. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. BioMe research International;2015. Doi: 10.1155/2015/421746
3. Martin V, Bettencourt A. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. Mater Sci Eng C. 2018;82:363–71. Available from: doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.038
4. Boskey AL, Coleman R, Aging of Bones and Teeth. Elements. 2007;3:385–92. Doi:10.1177/0022034510377791
5. Mansour A, Mezour MA, Badran Z, Tamimi F. Extracellular Matrices for Bone Regeneration: A Literature Review. Tissue Eng Part A [Internet]. 2017;23:ten.tea.2017.0026. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2017.0026>
6. H.I.Roach. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. Vol. 18, Cell Biology International. 1994. p. 617–28.
7. Xiao W, Wang Y, Pacios S, Li S, Graves DT. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. Front Oral Biol. 2015;18:9–16. Doi:
8. Front biosci. Bone mineralization, Frontiers in Bioscience. 2012;100–28. PMID: 22201735
9. Liu Y, Luo D, Wang T. Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. 2016;1–22. Doi:10.1002/sml.201600626
10. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. Bone. 2015;80:14–8. Doi:10.1016/J.bone.2015.04.035
11. Moran MM, Viridi AS, Sena K, Mazzone SR, McNulty MA, Sumner DR. Intramembranous bone regeneration differs among common inbred mouse strains following marrow ablation. J Orthop Res. 2015;33(9):1374–81. Doi:10.1002/jor.22901
12. Blair HC, Sun L, Kohanski RA. Balanced regulation of proliferation, growth, differentiation, and degradation in skeletal cells. Ann N Y Acad Sci. 2007;1116:165–73. Doi:10.1196/annals.1402.029
13. Li G, Zhou T, Lin S, Shi S, Lin Y. Nanomaterials for Craniofacial and Dental Tissue Engineering. J Dent Res. 2017;96(7):725–32. Doi:10.1177/0022034517706678
14. Reynolds MA, Kao RT, Nares S, Camargo PM, Caton JG, Clem DS, et al. Periodontal Regeneration — Intrabony Defects: Practical Applications From the AAP

Regeneration Workshop . JPeriodontol, 2015;(February).
Doi:10.1902/jop.2015.140378

15. Singh PK, Kumari A. Prevalence and Distribution of Different Types of Bone Defects in Chronic Periodontitis In Bagalkot Subjects - A Clinical Study. 2017;5(3):284–9. Doi:10.17354/ijss/2017/314
16. Liu WEIWEI, Zhang CHUYI, Li JYIN, Zhang MF, Guo ZHUM. A novel classification system for the evaluation and reconstruction of oral defects following oncological surgery. 2017;(December 2013):7049–54. Doi:10.3892/ol.2017.7139
17. Shrivats AR, McDermott MC, Hollinger JO. Bone tissue engineering: State of the union. Drug Discov Today. 2014;19(6):781–6. Doi:10.1016/j.drudis.2014.04.10
18. Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: Material and matrix considerations. J Bone Jt Surg - Ser A. 2008;90(SUPPL. 1):36–42. Doi:10.2106/JBJS.G.01260
19. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. Bioact Mater 2017;2(4):224–47. Doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007
20. 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. Nat Publ Gr. 2013;1(3):216–48. Doi:10.4248/BR201303002
21. Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. Bone Joint J2016;6–9. Doi: 10.1302/0301-620X.98B1
22. Hoexter DL. BONE REGENERATION GRAFT MATERIALS. J Oral Implantol. 2002;3–7. Doi: 10.2478/v10136-009-0013-9
23. Shibuya N, Jupiter DC. Bone Graft Substitute: Allograft and Xenograft. Clin Podiatr Med Surg. 2015;32(1):21–34. Doi:10.1016/j.jcpm.2014.09.11
24. Kumar P, Vinitha B, Fathima G. Bone grafts in dentistry. Dent Sci. 2013;5(June):125–8. Doi:10.4103/0975-7406.113312
25. Dhillon RS, Schwarz EM, Maloney MD. Platelet-rich plasma therapy - future or trend? Dhillon al Arthritis Res Ther. 2012;1–10. Doi:10.1186/AR3414
26. Padiyal-Molina M, O'Valle F, Lanis A, Mesa F, Dohan Ehrenfest DM, Wang HL, et al. Clinical application of mesenchymal stem cells and novel supportive therapies for oral bone regeneration. Biomed Res Int. 2015;2015. Doi:10.1155/2015/341327
27. Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: Strategies, stem cells and scaffolds. J Anat. 2008;213(1):66–72. Doi:10.1111/j.1469-7580.208.00878.x
28. Schmitz JP HJ. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop Relat Res. 1986;205:299–

308.PMID:3084153

29. Li Y, Chen S, Li L, Qin L. ScienceDirect Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2015; Doi:10.1016/j.jot.2015.05.002
30. Gomes PS, Fernandes MH. Review Article Rodent models in bone-related research : the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratoire animaux*. 2011;45:14-24. Doi:10.1258/10.2010.01.0085
31. Jordan H V. Rodent Model Systems in Periodontal Disease Research. *Journal of Dental Research*. 1971;50 (2):236-42. Doi:10.1177/00220345710500021301
32. Pellegrini G, Seol Y.J, Gruber R, GVW. Pre-clinical Models for Oral and Periodontal Reconstructive Therapies. *J Dent Research*. 2009;1065–76. Doi:10.1177/0022034509349748
33. Bigham-Sadegh A, Oryan A. Selection of animal models for pre-clinical strategies in evaluating the fracture healing, bone graft substitutes and bone tissue regeneration and engineering. *Connect Tissue Res*. 2015;56(3):175–94. Doi:10.3109/03008207.2015.1027341
34. Honma T, Itagaki T, Nakamura M, Kamakura S, Takahashi I, Echigo S, et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Diseases*, 2008;457–64. Doi:10.1111/j1601-0825.207.01401.x
35. McGovern JA, Griffin M, Huttmacher DW. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Dis Model Mech*. 2018;11(4) Doi:dmm033084.
36. Chennazhi KTSKP, Kawahara HTK, Jayakumar SVNR. Fabrication of three-dimensional nano , micro and micro / nano scaffolds of porous poly (lactic acid) by electrospinning and comparison of cell infiltration by Z-stacking / three-dimensional projection technique. *IET Nano Biotechnologies*. 2012;6(March 2011):16–25. Doi:10.1049/iet-nbt.1011.0028
37. Asa F, Pagni G, Pilipchuk SP, Gianni AB, Giannobile W V, Rasperini G. 3D-Printed Scaffolds and Biomaterials : Review of Alveolar Bone Augmentation and Periodontal Regeneration Applications. *Int J Ent*;2016;15. Doi:10.1155/2016/1239842
38. Wang M, Favi P, Cheng X, Golshan NH, Ziemer KS, Keidar M, et al. Acta Biomaterialia Cold atmospheric plasma (CAP) surface nanomodified 3D printed polylactic acid (PLA) scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomater*. 2016;46:256–65. A Doi:10.1016/j.actbio.2016.09.030
39. De Misquita MRDOF, Bentini R, Goncalves F. The performance of bone tissue engineering scaffolds in in vivo animal models: A systematic review. *J Biomater Appl*. 2016;31(5):625–36 Doi:10.1177/0885328216656476.
40. Guilak, Butler David L GSA. Biomechanics and mechanobiology in functional tissue engineering. *J Biomech*. 2014;47(9):1933–40. Doi:10.1016/j.jbiomech.2014.04.019

41. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol.* 2012;30(10):546–54. Doi:10.1016/j.tibtech.2012.07.005
42. Liang T, Mahalingam S, Edirisinghe M. Creating “hotels” for cells by electrospinning honeycomb-like polymeric structures. *Mater Sci Eng C.* 2013;33(7):4384–91. Doi:10.1016/j.mss.2013.06.036
43. Bajaj P, Schweller RM, Khademhosseini A. 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014;(16):247–76. Doi:10.1146/annurv-bioeng-071813-105155
44. Kishan AP, Cosgriff-Hernandez EM. Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2017;105(10):2892–905. Doi:10.1002/jbm.a.36.124
45. Brien CMO, Holmes B, Faucett S, Zhang LG. Three-Dimensional Printing of Nanomaterial Scaffolds for Complex Tissue Regeneration. *tisure Eng Part B Rev* 2015;21(1). Doi:10.1089/ten
46. Billiet T, Vandenhoute M, Schelfhout J, Vlierberghe S Van, Dubrueel P. Biomaterials A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials .* 2012;33(26):6020–41. Doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.050
47. Li J, Chen M, Fan X, Zhou H. Recent advances in bioprinting techniques : approaches , applications and future prospects. *J Transl Med.* 2016;1–15. Doi:10.1186/s12967-016-1028-0
48. Willerth SM. 3-D Bioprinting of Neural Tissue for Applications in Cell Therapy and Drug Screening. *Front Bioeng Biotechol.* 2017;5(November):1–11. Doi:10.3389/fbioe.2017.00069
49. Wen L, Tang F. Single-cell sequencing in stem cell biology. *Genome Biol.* 2016;1–12. Doi:10.1186/s13059-016-0941-0
50. Shyh-chang N, Ng H. The metabolic programming of stem cells. *Genes Dev.* 2017 :336–46. Doi:10.1101/gad.293167.116
51. Mortada I, Mortada R. Epigenetic changes in mesenchymal stem cells differentiation. *Eur J Med Genet [Internet].* 2018;61(2):114–8. Doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.015
52. Liu H, Xia X, Li B. Mesenchymal stem cell aging: Mechanisms and influences on skeletal and non-skeletal tissues. *Exp Biol Med.* 2015;240(8):1099–106. Doi:10.1177/1535370215591828
53. Oryan A, Kamali A, Moshirib A, Eslaminejad MB. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence?. *Cells Tissues Organs.* 2017;204(2):59–83. Doi:10.1159/000469704
54. Ankrum, J, Faini, J, M J. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol.* 2015;32(3):252–60. Doi:10.1038/nbt.2816

55. Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells : environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Revista*2013;45(11):e54-16. Doi:10.1038/emm.2013.94
56. Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. Mesenchymal stem cells : key players in cancer progression. *Mol Cancer*. 2017;1–10. Doi:10.1186/s12943-017-0597-8
57. Drug R. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine : What Is the Evidence ?. *Cells Tissues Organs*. 2017;59–83. Doi:10.1159/000469704
58. Chalisserry EP, Nam SY, Park SH, Anil S. Therapeutic potential of dental stem cells. *J Tissues Eng*.2017; paginas Doi:10.1177/2041731417702531
59. Aurrekoetxea M, Garcia-Gallastegui P, Irastorza I, Luzuriaga J, Uribe-Etxebarria V, Unda F, et al. Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues. *Front Physiol*. 2015;6(OCT):1–10. Doi:10.3389/fphys.2015.00289
60. Amini, Ami R; Laurencin, Cato T; Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges *Ami. Crit Rev Biomed Eng*. 2013;40(5):363–408. PMID:223339648
61. Bae H, Ph D, Kwon I, Ph D, Lee E. Osteoblastic / Cementoblastic and Neural Differentiation of Dental Stem Cells and Their Applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012; 18(3): 235–244. DOI: 10.1089/ten.teb.2011.0642
62. Nuti N, Corallo C, Chan BMF, Ferrari M. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells : a Literature Review. *Stem Cell Rev Reports*. *Stem Cell Rev*. 2016; 12(5):511-523. DOI:10.1007/s12015-016-9661-9
63. Yasui T, Mabuchi Y, Toriumi H, Ebine T, Niibe K, Houlihan DD, et al. Purified Human Dental Pulp Stem Cells Promote Osteogenic Regeneration. *J Dent Res*. 2016;95(2):206-14. DOI: 10.1177/0022034515610748.
64. Zhang W, Walboomers XF, Kuppevelt TH Van, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*. 2006; 27 (33): 5658-68. DOI:10.1016/j.biomaterials.2006.07.013
65. Chen;MingFa LXL. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog Polym Sci*. 2016;1;53:86-168. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004
66. Gomes ME, Reis RL, Gomes ME, Reis RL. Biodegradable polymers and composites in biomedical applications : from catgut to tissue engineering . Part 1 *J International Materials Reviews*. 2004;49(5):6261-273. <https://doi.org/10.1179/095066004225021918>
67. Castro-aguirre E, Iñiguez-franco F, Samsudin H, Fang X, Auras R. Poly (lactic acid) — Mass production , processing , industrial applications , and end of life. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;107:333-366. DOI: 10.1016/j.addr.2016.03.010.

68. Li L, Ding S, Zhou C. Preparation and Degradation of PLA / Chitosan Composite Materials. *Journal of Applied Polymer*. 2003;(April):1–4. <https://doi.org/10.1002/app.12954>
69. Gregor A, Filová E, Novák M, Kronek J, Chlup H, Blahnová V, et al. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *J Biol Eng*. 2017;11:31. DOI: 10.1186/s13036-017-0074-3
70. Ricardo M, Oliveira D, Misquita F De, Bentini R, Goncalves F. The performance of bone tissue engineering scaffolds in in vivo animal models : A systematic review. *J Biomater Appl*. 2016;31(5):625-636. DOI: 10.1177/0885328216656476
71. Narayanan G, Vernekar VN, Kuyinu EL, Laurencin CT. Poly (lactic acid) -based biomaterials for orthopaedic regenerative engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;107:247-276. DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.015.
72. Cristian M, Conde M, Demarco FF, Alcazar JC, Nör JE, Beatriz S. Influence of Poly-L-Lactic Acid Scaffold ' s Pore Size on the Proliferation and Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *Braz Dent J*. 2015;26(2):93-8. doi: 10.1590/0103-6440201300032.
73. Kim H, Amirthalingam S, Kim S. Biomimetic Materials and Fabrication Approaches for Bone Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater*. 2017;6(23). DOI: 10.1002/adhm.201700612.
74. Savaris M, Santos V, Brandalise RN. Influence of different sterilization processes on the properties of commercial poly (lactic acid). *Mater Sci Eng C [Internet]*. 2016;69:661–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.031>
75. Peniston SJ, Choi SJ. Effect of Sterilization on the Physicochemical Properties of Molded Poly (L -lactic acid). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;80(1):67-77. DOI: 10.1002/jbm.b.30570
76. Cheruthazhekatt S, Mirko Č, Slavi P, Havel J. Gas plasmas and plasma modified materials in medicine. *Journal of APPLIED BIOMEDICINE* 2010;8(2):55–66. DOI: 10.2478/v10136-009-0013-9
77. Qi X, Pei P, Zhu M. Three dimensional printing of calcium sulfate and mesoporous bioactive glass scaffolds for improving bone regeneration *in vitro* and *in vivo*. *Scientific Reports*, 7:42556, DOI: 10.1038/srep42556
78. An J, Teoh M, Suntornnond R. Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues. *Engineering* 2015, 1(2): 261–268 DOI 10.15302/J-ENG-2015061
79. Tatsuhiro F, Seiko T, Yusuke T, Reiko T. Dental Pulp Stem Cell-Derived , Scaffold-Free Constructs for Bone Regeneration. 2018;
80. Jensen J, Tvedesøe C, Rölfing J. Dental pulp-derived stromal cells exhibit a higher osteogenic potency than bone marrow-derived stromal cells in vitro and in a porcine critical-size bone defect model. *SICOT J* 2016, 2, 16. DOI: 10.1051/sicotj/2016004

81. Chung S, King MW. Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds. *Biotechnol Appl Biochem*. 2011;58(6):423–38. doi: 10.1002/bab.60.
82. Leonga K, Chuaa C, Sudarmadjia N. Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* (2008) 140–152, doi:10.1016/j.jmbbm.2007.11.002
83. Yanga N, Quanc Z, Zhangd D. Multi-morphology transition hybridization CAD design of minimal surface porous structures for use in tissue engineering. *Computer-Aided Design* 56 (2014) 11–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cad.2014.06.006>
84. Li J, Chen M, Wei X. Evaluation of 3D-Printed Polycaprolactone Scaffolds Coated with Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma for Bone Regeneration. *Materials* 2017, 10, 831; doi:10.3390/ma10070831
85. Sela. J B. Principles of bone regeneration. 2012. 153 p.