

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A :

ZAVALA AYALA KAREN STEFANY

Directora de tesis: Dra. Janeth Serrano Bello

Asesor(es): Mtro. Ricardo Gamaliel González Andrade



Ciudad de México, 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.

Dedicatorias

¶ mis padres

Por ser los principales promotores de mis sueños, los seres a los que más quiero en este mundo, por demostrarme con hechos que harían cualquier cosa por mí, porque jamás se detuvieron ante ningún obstáculo o circunstancia para ayudarme. Por extenderme su mano, por convertir los malos pasos en momentos de reflexión, por escucharme y siempre tener una palabra de aliento, por prestarme su hombro para desahogarme en llanto, por ser mi cómplice en tantas travesuras, por enseñarme a valorar los resultados de un gran esfuerzo, por ayudarme a conocer el precio de tener una gota de sudor en la frente, por ser mis amigos y por ocupar un lugar muy especial en mi corazón.

Quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcarme el esfuerzo y valentía, por nunca soltarme de la mano y guiarme por el buen camino, por ser ese ejemplo a seguir y demostrarme que nada en la vida es fácil, que con esfuerzo y dedicación se puede lograr lo que uno se propone.

Gracias por ser un ejemplo de fortaleza, gracias por ser ese cimiento tan importante en mi vida.

¶ mi hermano

Por ser parte de uno de los grandes sueños que están a punto de convertirse en realidad, por compartir las alegrías y tropiezos de los cuales siempre hemos salido triunfadores, por su confianza, por ser ese hombre ejemplar y por siempre impulsarme con tantas palabras. Te amo demasiado.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

Agradecimientos

En primera instancia a mi alma mater, la UNAM que me acogió durante 4 años para poder realizarme profesionalmente y académicamente, bajo el aprendizaje de grandes maestros.

¶ A la Dra. Janeth Serrano Bello

Por ser mi directora de tesis, por ser un ejemplo tanto profesional como personal, por las horas brindadas a esta investigación que también es de ella, por su dedicación y esfuerzo, porque ha demostrado ser excelente maestra y ser humano. Por motivarme y reconocer cada paso y cada logro en mí, por contribuir a mi crecimiento intelectual y personal.

¶ Al Mtro. Ricardo Gamaliel

Por el tiempo dedicado a la minuciosa revisión de este trabajo y por todas las lecciones brindadas dentro del aula, me siento muy afortunada de haber sido su alumna, pero más afortunada aún de ser su colega.

¶ A Javier Oswaldo Pérez Zamora

Por ser ese tercer hermano que llegó a mi vida hace 5 años, como una mano derecha, te agradezco por ser parte de este proceso de crecimiento tanto personal, académico y profesional, por tus consejos, las risas y esas palabras de aliento. Te amo con todo mí ser.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

A Andrea Jiménez Ramírez por ser parte de este crecimiento personal y profesional, por ser esa amiga. Te amo

A Lucía Pérez Sánchez por su apoyo, por su comprensión y los conocimientos compartidos en este trayecto.

Agradezco al Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la FO UNAM, en especial al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez y a la Dra. Patricia González Alva, por su apoyo y palabras de aliento.

Agradezco al Laboratorio de Biomateriales Dentales (DEPeI) de la FO UNAM, en especial al Dr. Carlos A. Álvarez Gayosso, por su apoyo e instrucción.

Al Instituto Física de la UNAM, principalmente al M.C Manuel Aguilar Franco por su apoyo.

A la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina UNAM y a la Unidad de Bioterio (DEPeI) FO UNAM, en especial al Sr. Juan Manuel Trejo Ramírez por su apoyo técnico en el cuidado y manejo de los animales de laboratorio.

Se agradece al proyecto DGAPA – UNAM – PAPIIT IA205818 por la beca otorgada y el financiamiento para el presente proyecto.

Y por último agradecer a Dios por prestarme la vida, por llevarme por el sendero y cuidar de nosotros, por regalarme esta familia tan hermosa que tengo.

“La gente habla de conseguir golpes de suerte en sus carreras. Yo soy la prueba de que la teoría de los golpes de suerte es simplemente errónea. Uno consigue su propia suerte. El mundo está dirigido por los que se dan a conocer, no por los que esperan a que se pregunte por ellos”

– Steve Blank-

Índice

RESUMEN

SUMMARY

Abreviaturas y siglas

INTRODUCCIÓN..... 8

I- MARCO TEÓRICO..... 9

1. Tejido óseo 9

1.1 Histología del tejido óseo 9

1.2 Tipos de tejido óseo..... 10

1.2.1 Hueso cortical o compacto..... 10

1.2.2 Hueso trabecular o esponjoso 11

2. Defectos óseos..... 11

3. Modelación y Remodelación ósea 11

3.1 Fases del remodelado..... 11

4. Regeneración tisular y ósea..... 12

5. Injertos 13

6. Ingeniería de tejidos..... 13

7. Bioingeniería de tejidos 14

8. Biomateriales..... 15

8.1 Polímeros..... 15

8.2 Aplicaciones biomédicas..... 15

9. Ácido poliláctico 16

10. Impresión en 3D para biomateriales 16

11. Tipos de impresión 3D para biomateriales..... 17

12. Andamios..... 18

13. Biocompatibilidad 18

13.1 Evaluación de la biocompatibilidad..... 18

14. Biodegradabilidad del Ácido Poliláctico 19

15. Inflamación 20

15.1 Fisiopatología de la inflamación 20

15.2 Clasificación de la inflamación 22

16. Reacción granulomatosa de tipo cuerpo extraño..... 24

16.1 Reacción a cuerpo extraño: el caso de los biomateriales..... 25

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

II• PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
III• HIPÓTESIS	30
IV• OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo general	31
4.2 Objetivos específicos	31
V• MATERIAL Y MÉTODO.....	32
5.1 Clasificación del tipo de estudio.....	32
5.2 Universo de estudio.....	32
5.3 Muestra	32
5.4 Criterios de selección	32
5.5 Material	33
VI• MÉTODO	34
Primera Fase (<i>in vitro</i>).....	34
6.1 Impresión de andamios de poli (ácido-láctico) PLA.....	34
6.2 Esterilización de andamios de PLA con plasma de peróxido de hidrógeno (Sterrad).....	34
6.3 <i>Degradación in vitro</i>	34
6.4 Evaluación de pH	35
6.5 Evaluación del espesor, diámetro y peso	35
6.6 Pruebas mecánicas.....	35
6.7 Evaluación de la estructura superficial de los andamios de PLA por MEB	35
Segunda Fase (<i>in vivo</i>).....	37
6.8 Procedimiento quirúrgico con ratas macho <i>Wistar</i>	37
6.9 Recuperación de la muestra.....	39
6.9.1 Evaluación de la respuesta inflamatoria	39
6.10 Evaluación Histológica	39
VII• VARIABLES	40
VIII• DISEÑO ESTADÍSTICO.....	41
IX• ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES	42
X• RESULTADOS	43
10.1 Resultados <i>in vitro</i>	43
10.1.1 Evaluación de peso.....	43
10.1.2 Evaluación de diámetro	44

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

10.1.3 Evaluación de espesor	45
10.1.4 Evaluación de pH	46
10.1.5 Resultados de las pruebas mecánicas	47
10.1.6 Evaluación de estructura superficial de los andamios de PLA por MEB	48
10.2 Resultados <i>in vivo</i>.....	57
10.2.1 Evaluación histológica de la respuesta inflamatoria en tejido subcutáneo en ratas Wistar.	57
XI• DISCUSIÓN	62
XII• CONCLUSIONES	66
A• Tabla de resultados. Evaluación de peso <i>in vitro</i> de andamios 3D experimental	72
B• Tabla de resultados. Evaluación de diámetro <i>in vitro</i> de andamios 3D experimental	73
C• Tabla de resultados. Evaluación de espesor <i>in vitro</i> de andamios 3D experimental	74
D• Tabla de resultados. Evaluación de PH <i>in vitro</i> de andamios 3D experimental ...	75
E• Tabla de resultados. Evaluación de peso <i>in vivo</i> de andamios 3D control.....	76
F• Tabla de resultados. Evaluación de diámetro <i>in vivo</i> de andamios 3D control	77
G• Tabla de resultados. Evaluación de espesor <i>in vivo</i> de andamios 3D control.....	78
H• Tabla de resultados. Evaluación de PH <i>in vivo</i> de andamios 3D control.....	79
I• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 20 días de la evaluación <i>in vitro</i> grupo experimental	80
J• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 60 días de la evaluación <i>in vitro</i> grupo experimental.....	81
K• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 100 días de la evaluación <i>in vitro</i> grupo experimental.....	82
L• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 140 días de la evaluación <i>in vitro</i> grupo experimental.....	83
M• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 180 días de la evaluación <i>in vitro</i> grupo experimental.....	84
N• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 20 días de la evaluación <i>in vivo</i> grupo control	85
O• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 60 días de la evaluación <i>in vivo</i> grupo control	86
P• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 100 días de la evaluación <i>in vivo</i> grupo control	87

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

Q• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 140 días de la evaluación <i>in vivo</i> grupo control	88
R• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 180 días de la evaluación <i>in vivo</i> grupo control	89
S• Tabla de pruebas histológicas	90

Índice de figuras

Figura 1. Elementos básicos en la ingeniería tisular.....	7
Figura 2. Representación de la hidrólisis de polisacáridos.....	12
Figura 3. Esquema de los eventos que constituyen la reacción a cuerpo extraño	18
Figura 4. Principales actividades de los factores de crecimiento durante la cicatrización cutánea.....	18
Figura 5. Fase in vitro.....	29
Figura 6. Procedimiento quirúrgico en modelo animal.....	31
Figura 7. Resultado de la evaluación de peso del grupo control y grupo experimental.....	36
Figura 8. Resultado de la evaluación de diámetro del grupo control y grupo experimental.....	37
Figura 9. Resultado de la evaluación de espesor del grupo control y grupo experimental.....	38
Figura 10. Resultado de la evaluación de pH del grupo control y grupo experimental.....	39
Figura 11. Resultados promedio general del grupo control y experimental....	40
Figura 12. Fotomicrografías grupo control y experimental.....	42
Figura 13. Resultados del grosor inicial.....	44
Figura 14. Resultados del grosor a los 20 días.....	45
Figura 15. Resultados del grosor a los 60 días.....	46
Figura 16. Resultados del grosor a los 100 días.....	47
Figura 17. Resultados del grosor a los 140 días.....	48
Figura 18. Resultados del grosor a los 180 días.....	49
Figura 19. Fotomicrografía de las muestras histológicas teñidas con H&E....	51

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

Figura 20. Gráfica del promedio mínimo de la formación de la cápsula de inflamación.....	52
Figura 21. Gráfica del promedio máximo de la formación de la cápsula de la inflamación.....	53
Figura 22. Conteo celular.....	54

RESUMEN

Es sabido que en el campo de la odontología, existen diferentes patologías como el cáncer de cabeza y cuello, la enfermedad periodontal y traumatismos en donde se ve afectada la pérdida ósea. Por esta razón la bioingeniería de tejidos ha desarrollado nuevos descubrimientos, los cuáles, permiten un incremento en el uso de biomatrices creadas a partir de polímeros biocompatibles con el cuerpo humano que funcionan como osteoconductor, imitando la matriz ósea y favoreciendo a través de su diseño poroso la regeneración ósea guiada.

El uso de los diferentes polímeros ha dado paso a nuevas posibilidades del manejo terapéutico en este tipo de pacientes, ya que se opta por utilizarlos como un injerto para poder llevar a cabo la reparación ósea a partir de la absorción y la neoformación presentando una velocidad media y estimular la regeneración con este injerto.

Es por ello que en el presente estudio se evaluó la capacidad de degradación y biocompatibilidad de los andamios impresos en 3D, realizando pruebas de degradación con Phosphate Buffered Saline (PBS) y agua bidestilada para posteriormente evaluar la compresión a través de pruebas mecánicas, espesor, diámetro y peso de dichos andamios. Además, por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se observó y analizó la microestructura de los andamios recubiertos con nanopartículas de oro.

Por último de manera *in vivo* se valoró la respuesta histológica y el grado de inflamación que provocaron los andamios de poliácido láctico (PLA) al colocarlos en el tejido celular subcutáneo de ratas macho cepa *Wistar* a diferentes periodos de tiempo, inicial, 20, 60, 100, 140 y 180 días.

Después de ser analizados los andamios de PLA, se demostró que son biocompatibles para el tejido lo cual es una alternativa útil en la ingeniería de tejidos para lograr la traslación de nanomateriales poliméricos con futuras aplicaciones en medicina regenerativa, ya que no modifico de manera considerable la estructura del andamio y su respuesta *in vivo* no causo reacción inflamatoria severa.

SUMMARY

It is known that in the field of dentistry, there are different pathologies such as head and neck cancer, periodontal disease and trauma where bone loss is affected. For this reason, tissue bioengineering has developed new discoveries, which allow an increase in the use of biomatrices created from biocompatible polymers with the human body that function as an osteoconductor, mimicking the bone matrix and favoring its porous design guided bone regeneration.

The use of the different polymers has given way to new possibilities of therapeutic management in this type of patients, since it is chosen to use them as a graft to be able to carry out bone repair from absorption and neoformation presenting a medium speed and stimulate regeneration with this graft.

That is why in the present study the degradation and biocompatibility capacity of 3D printed scaffolds was evaluated, performing degradation tests with Phosphate Buffered Saline (PBS) and double-distilled water to subsequently evaluate compression through mechanical tests, thickness, diameter and weight of said scaffolding. In addition, the microstructure of scaffolds coated with gold nanoparticles was observed and analyzed using Scanning Electron Microscopy (SEM).

Finally, in vivo, the histological response and the degree of inflammation caused by the lactic polyacid scaffolds (PLA) were placed when placed in the subcutaneous cellular tissue of male Wistar strain rats at different periods of time, initial, 20, 60, 100, 140 and 180 days.

After the scaffolding of PLA was analyzed, it was shown that they are biocompatible for the tissue which is a useful alternative in tissue engineering to achieve the translation of polymeric nanomaterials with future applications in regenerative medicine, since I do not significantly modify the Scaffolding structure and its response in vivo did not cause severe inflammatory reaction.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

Abreviaturas y siglas

3D: Estructura tridimensional

ANOVA: Análisis de Varianza

Ag: Antígeno

IL: Interleuquina

INF – γ : Interferon gamma

MEB: Microscopía Electrónica de Barrido

mm: milímetros

ml: mililitros

NOM: Norma Oficial Mexicana

PLA: Ácido Poliláctico

PBS: Buffer de fosfatos (por sus siglas en inglés Phosphate buffered)

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (por sus siglas en inglés Platelet derived growth factor)

ROG: Regeneración Ósea Guiada

RTG: Regeneración Tisular Guiada

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante Beta

Tg: Temperatura vítrea

Tm: Temperatura

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México

INTRODUCCIÓN

Las recientes investigaciones en la rama médico-biológica han favorecido el aporte a la rama odontológica creando modelos tridimensionales de polímeros, cuya investigación va encaminada a la reparación y regeneración de tejidos, principalmente óseo, fomentando una creciente mejora en la regeneración de dicho tejido.

El campo de la bioingeniería de tejidos permite desarrollar biomatrices que funcionan como andamios, los cuales imitan a la matriz ósea favoreciendo el restablecimiento de la funcionalidad tisular y ósea, otorgando factores con la característica de ser un osteoconductor permitiendo que a través de su diseño poroso favorezca e induzca a la regeneración ósea y tisular.

La necesidad de restaurar la salud y los defectos generados por las distintas patologías han llevado al uso de aloinjertos, xenoinjertos y sustitutos óseos compuestos de diferentes biomateriales, logrando de esta manera la regeneración ósea, teniendo como definición de esta la restitución de tejidos óseo. De este modo la ingeniería de tejidos al ser un campo multidisciplinario que se vale de tres agente principales: la fuente celular, el andamio y las biomoléculas o biomateriales y al relacionarse ofrece la creación de andamios que permitan restaurar los tejidos perdidos.

Los polímeros sintéticos tienen la capacidad de degradarse mediante hidrólisis, en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo y eliminarse completamente por vías metabólicas, los andamios hechos de políácido láctico (PLA, por sus siglas en inglés) brindan la posibilidad de crear tejidos completamente naturales y funcionales.

Por tal motivo, en el presente proyecto se propone una serie de experimentos, con los cuales, se podrá evaluar el tiempo de degradación de los andamios de PLA impresos en 3D, así como la respuesta en tejido celular subcutáneo de ratas *Wistar* con el cual se estableció su biocompatibilidad reportando su degradación, para lo cual, se realizaron pruebas de degradación *in vitro*, así como, la evaluación de la respuesta tisular alrededor del andamio en tejido celular subcutáneo de ratas *Wistar*.

I• MARCO TEÓRICO

1. Tejido óseo

El tejido óseo es el principal tejido de sostén y protección del cuerpo humano, tiene la función de almacén y regulador metabólico de elementos como el calcio y el fósforo o como productor de las células sanguíneas mediante la hematopoyesis⁽¹⁾.

El hueso está sujeto constantemente al remodelado desde su desarrollo, esta característica le otorga la propiedad de ser el único tejido capaz de repararse a sí mismo sin dejar cicatrices⁽²⁾.

1.1 Histología del tejido óseo

Tiene una matriz abundante y células muy separadas entre sí. La matriz está formada por: 25% de agua, 25% de fibras proteínicas y 50% de sales minerales cristalizadas⁽³⁾.

El tejido óseo está compuesto por diferentes tipos celulares, las cuales son:

- Las células osteoprogenitoras derivan de células madre mesenquimáticas, son células en reposo que tienen la potencialidad de diferenciarse en muchos tipos de células⁽⁴⁾.
- Células osteógenas: son células madre, no especializadas con capacidad de división; sus células hijas son los osteoblastos; se localizan en la porción interna del periostio y del endostio⁽⁴⁾.
- Osteoblastos: son las células que construyen los huesos; sintetizan los componentes de la matriz del tejido óseo e inician en proceso de calcificación⁽⁴⁾.
- Osteocitos: son células maduras principales del tejido óseo; derivan de los osteoblastos que van quedando encerrados en cavidades de matriz extracelular denominadas lagunas e intercambian nutrientes con la sangre⁽⁴⁾.
- Osteoclastos: son células muy grandes, formadas por la fusión de 50 monocitos, ubicados en el endostio; producen destrucción del hueso por medio de enzimas lisosómicas para permitir el desarrollo, crecimiento, mantenimiento y reparación normales del hueso. Derivan de la fusión de células progenitoras hemopoyéticas mononucleares bajo efecto de citosinas múltiples^(3,4).

1.2 Tipos de tejido óseo

Existen clasificaciones de hueso; según qué época del desarrollo se trate.

- ✓ Hueso primario, inmaduro, plexiforme o primitivo, cuenta con características como fibras de colágenas gruesas y desordenadas, no cuenta con organización laminar y las células están situadas al azar. El hueso primario se presenta en la etapa embrionaria y en el recién nacido tiene una sustitución progresiva hasta los años. En el adulto los restos se encuentran en las inserciones tendinosas-ligamentarias, alveolos, suturas, oído. Sus propiedades lo vuelven más flexible, débil y deformable^(5,6).
- ✓ Hueso secundario, maduro o laminar, tiene sistemas laminares ordenados de manera concreta y regular (diferente según el tipo de hueso esponjoso/cortical), sus fibras colágenas se encuentran organizadas y orientadas. Se localiza en el esqueleto a partir de los años, excepto patología: fractura, Paget, tumores. Su organización está en función de las cargas a soportar, es mecánicamente anisotrópico^(5,6).

1.2.1 Hueso cortical o compacto

Se encuentra compuesto de 2 tipos de tejido: hueso lamelar y el hueso fibroso, dividido en primario y secundario según el estado de desarrollo en el que se encuentre⁽⁷⁾.

El hueso cortical tiene baja porosidad entre 0.05 y 0.1 y constituye el 80% del esqueleto humano, aportando protección y soporte; está estructurado mediante láminas o anillos concéntricos alrededor de canales centrales llamados canales o conductos de Havers⁽⁷⁾.

Los canales de Havers u osteón están definidos como el conjunto de un canal central, con láminas concéntricas que lo rodean y las lacunae, canalículos y osteocitos, se encuentran conectados con los canales de Volkmann que perforan el periostio y perpendiculares al osteón, ambos atravesados por los canales linfáticos, sanguíneos y nerviosos para extenderse en el hueso⁽⁷⁾.

Entre las láminas concéntricas de matriz mineralizada hay lagunas donde se encuentran los osteocitos, éstas últimas son espacios ubicados entre los anillos de laminillas, las láminas entre osteones se llaman láminas intersticiales y circunferenciales^(3,7).

1.2.2 Hueso trabecular o esponjoso

Se encuentra compuesto de 2 tipos de tejido: hueso lamelar y el hueso fibroso, el cual tiene una porosidad entre 0.75 y 0.95. El hueso trabecular constituyente principalmente la epífisis de los huesos largos⁽⁷⁾.

Una característica principal del hueso trabecular es que no posee osteones, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques o placas llamadas espículas o trabéculas, dentro de estas trabecular se encuentran los osteocitos ya que yacen con canalículos que irradian desde las mismas. Los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos⁽⁷⁾.

2. Defectos óseos

Existen diferentes tipos de defectos óseos, uno de ellos es el defecto de tamaño crítico, en el cual no se puede producir una curación espontánea⁽⁸⁾.

En la región maxilofacial los defectos óseos son muy prevalentes como resultado de la enfermedad periodontal, traumatismos, del tratamiento quirúrgico de tumores, malformaciones congénitas, casos de atrofia del reborde alveolar de los maxilares después de pérdidas dentales, de defectos por cirugía alveolar y de utilización de prótesis dentales. Generalmente estos defectos se solucionan con la colocación de implantes y prótesis dentales, pero muchas ocasiones la pérdida imposibilita la rehabilitación^(8,9).

3. Modelación y Remodelación ósea

La modelación sólo se da durante el desarrollo del esqueleto, durante la madurez con persistencia de osteogénesis en el periostio y de reabsorción en el endostio. El remodelado permite la reparación de zonas débiles–microfracturas, mejora la distribución vascular del hueso y mantiene la homeostasis mineral⁽⁵⁾.

3.1 Fases del remodelado

- Fase quiescente: Los factores que inician el proceso de remodelado aun no son conocidos⁽¹⁰⁾.

- Fase de activación: El primer fenómeno que tiene lugar es la reabsorción mediante la retracción de las células limitantes y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas⁽¹⁰⁾.
- Fase de reabsorción: Los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide, es acabado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz⁽¹⁰⁾.
- Fase de formación: Se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación⁽¹⁰⁾.
- Fase de mineralización: A los 30 días del depósito de osteoide comienza la mineralización que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días del trabecular. Y de nuevo empieza fase quiescente o de descanso⁽¹⁰⁾.

4. Regeneración tisular y ósea

La regeneración tisular describe la cicatrización que conduce a la completa restauración de la morfología y función del tejido dañado. La regeneración ósea guiada (ROG) es una técnica quirúrgica que persigue la formación de hueso nuevo para el relleno de defectos óseos perimplantarios o en áreas deficitarias indicada en aquellos procedimientos quirúrgicos en los que las condiciones para la ROG estén limitadas⁽¹¹⁾.

En la utilización de los injertos óseos se puede emplear técnicas como la regeneración ósea guiada, se utiliza conjuntamente con los injertos en bloque para defectos de mayor volumen consiguiendo limitar en gran medida la reabsorción fisiológica de los injertos^(9,11).

Existen 2 tipos de membranas:

- Las reabsorbibles como las de colágeno, copolímeros, las de ácido Poliláctico y Poliglicólico. Este tipo de membranas no requieren ser retiradas, evitando así una nueva intervención^(12,13).
- ✓ Las no reabsorbibles: Como las de politetrafluoretileno y reforzadas con titanio⁽¹²⁾.

5. Injertos

Un injerto se define como cualquier material implantado que promueva la cicatrización, ya sea por sí mismo o en combinación con otro material. La utilización de injertos en la implantología dental tiene que ver con el origen y estructura de los mismos, lo cual se incluye en la clasificación actual de injertos^(13,14).

- ✓ **Autólogo (autoinjertos):** Se compone por tejido tomado del mismo individuo y proporciona mejores resultados, ya que no existen problemas de compatibilidad porque es el único que cumple con los 3 mecanismos de regeneración ósea (osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción), además evita el rechazo inmunológico. Pueden ser natural o cultivado in vitro^(15,16).
- ✓ **Homólogos (aloinjertos):** Se compone de tejido tomado de un individuo de la misma especie, no relacionado genéticamente con el receptor; cuenta con capacidad osteoinductiva y osteoconductor. Los aloinjertos pueden ser obtenidos a partir de donantes vivos o fallecidos. Existen 3 tipos de aloinjertos óseos: congelados, desecados (liofilizados) y desmineralizados⁽¹⁵⁾.
- ✓ **Isogénicos (isoinjertos):** Se componen por tejido tomado de un individuo genéticamente relacionado con el individuo receptor⁽¹⁵⁾.
- ✓ **Heterólogos (Xenoinjertos):** Se componen de tejido tomado de un donador de otra especie, además clínicamente no son aceptables debido a su gran antigenicidad. Su principal limitante es el alto riesgo de rechazo^(15,16).

Existen ciertos factores que pueden interferir en la formación de tejido óseo después de una lesión, como:

- Fracaso de la vascularización en la herida
- Inadecuada estabilización del coágulo y del tejido de granulación en el defecto
- Crecimiento interno de tejidos no óseos con alta actividad proliferativa
- Contaminación bacteriana⁽¹¹⁾.

6. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es una rama de la medicina regenerativa que estudia la formación de tejidos y órganos vivos de manera tridimensional y la función con el uso de andamios, células, factores biológicos y la estimulación biomecánica como biofísica para ayudar en la regeneración de los tejidos; representados en la Figura 1^(17,18).

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

La ingeniería de tejidos utiliza los principios que rigen el trasplante de células, las ciencias aplicadas y la ingeniería, orientado hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que permitan restablecer o mantener la función normal de un órgano o tejido⁽¹⁹⁾.

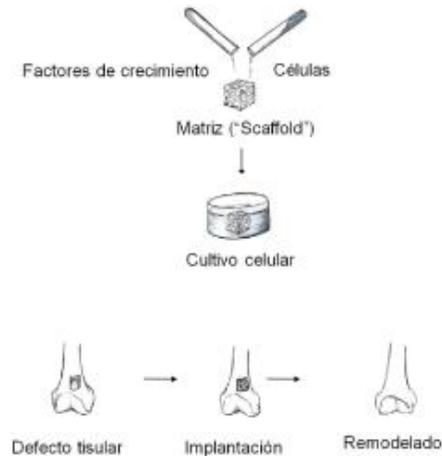


Figura 1. Elementos básicos en la Ingeniería Tisular – Tomada de (12)

7. Bioingeniería de tejidos

La bioingeniería de tejidos está encaminada a la reparación, regeneración o reemplazo bioartificial de tejidos y órganos del cuerpo humano, que han sido dañados por diversos factores como traumas, quemaduras, enfermedades adquiridas o anomalías congénitas, teniendo tres componentes fundamentales: Células aisladas o células sustitutas cuya función es evitar la complicación de la cirugía, permitiendo reemplazar solo las células que sean necesarias para que se lleve a cabo la regeneración. Morfógenos, factores de crecimiento y los andamios tridimensionales con o sin células donde se cultivan dentro de una matriz para posteriormente incorporarlas al cuerpo^(20–22).

Las estrategias en la ingeniería de tejidos pueden ser celulares y acelulares. El tipo celular implica previamente implantados en el tejido lesionado para estimular el crecimiento de nuevo tejido, mientras que el material de soporte en si es degradado gradualmente y solo el tejido recién generado permanece funcional. En la estrategia acelular, se busca el mismo resultado, pero con la diferencia de que el andamio es implantado en la región dañada para estimular la infiltración de células vecinas responsables de la deposición de matriz extracelular⁽²³⁾.

8. Biomateriales

Los biomateriales son materiales ya sea de origen natural (colágena, gelatina, seda, algodón y derivados de almidón) o artificial (poli ácido D, L-láctico, PLA, poli ácido glicólico, PGA, poli a-hidroxiácidos) que puede ser usada como parte de un sistema que permite aumentar o reemplazar parte de un sistema vivo utilizados como soportes, matrices o andamiajes^(24,25).

Los materiales de soporte utilizados deben de cumplir con características como: adecuada porosidad para favorecer la integración del tejido y la vascularización, biodegradabilidad controlada, compatibilidad histoquímica, estabilidad a largo plazo, ausencia de inmunogenicidad y citotoxicidad, no permitir la migración epitelial y de fibroblastos, pero sí de las células osteogénicas en el caso de tejido óseo y ser completamente reabsorbibles en un tiempo de 6 a 12 meses para ser sustituido por tejido neoformado^(16,26).

8.1 Polímeros

Los polímeros se pueden dividir en:

Naturales: Provenientes directamente del reino vegetal o animal, base de proteínas como el colágeno, albumina, seda o gelatina; se están modificando químicamente por diferentes vías para mejorar su resistencia mecánica o adecuar su velocidad de degradación y, por lo tanto, de reabsorción a los procesos de regeneración tisular, crecimiento celular o dosificación controlada y dirigida^(24,25).

Artificiales: Son el resultado de modificaciones mediante procesos químicos de ciertos polímeros naturales⁽²⁴⁾.

Sintéticos: Son los que se obtienen por procesos de polimerización controlados por el hombre a partir de materias primas de bajo peso molecular⁽²⁴⁾.

La utilización de materiales poliméricos tales como el polietileno, politetrafluoretileno, algunos polímeros de acrílico, poliésteres de la familia del politereftalato de etilenglicol, poliamidas, poliuretanos o cauchos de silicona han demostrado su utilidad y, sobre todo, su necesidad como soportes en los procesos de regeneración tisular y en los de crecimiento celular⁽²⁵⁾.

8.2 Aplicaciones biomédicas

Los biomateriales son empleados en distintos contextos y cada uno de ellos asociado a algún tipo de aplicación particular:

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

- Para reemplazo de partes dañadas, enfermas o faltantes; reemplazo de la articulación de la cadera, implantes y prótesis dentales.
- Para asistir en cicatrizaciones y curaciones; suturas quirúrgicas, placas y tornillos para fijación de fracturas óseas.
- Mejorar funciones: Marcapasos, lentes de contacto.
- En correcciones estéticas: modificación de labios, pecho, barbilla⁽²⁴⁾.

9. Ácido poliláctico

Uno de los polímeros que se encuentra en investigación es el poliácido láctico (PLA), el cual deriva de recursos renovables y degradables, no es tóxico, ni carcinogénico para el cuerpo humano, esto lo convierte en un excelente material para aplicaciones biomédicas. Se puede procesar por fundición de película, extrusión, moldeo por soplado y electro-hilado debido a su mayor capacidad de procesamiento térmico⁽²⁷⁾.

El homopolímero de PLA es un polvo blanco con valores de Temperatura vítrea (T_g) y Temperatura de degradación (T_m) de aproximadamente 55°C y 175°C respectivamente. El PLA de alto peso molecular es incoloro, brillante, rígido similar al poliestireno. Posee una vida media de degradación que varía de 6 meses a 2 años, dependiendo el tamaño, forma, su relación de isómero y la temperatura⁽²⁷⁾.

10. Impresión en 3D para biomateriales

Existen diferentes técnicas para la fabricación de andamios para bioingeniería de tejidos, una de ellas es la bioimpresión en 3D, la cual es un proceso de elaboración o construcción de objetos físicos a partir de modelos tridimensionales digitales mediante la aplicación de capas sucesivas de material de construcción. Un modelo es la representación digital de lo que se va a imprimir^(28,29).

La elaboración de modelos de 3D se realiza mediante equipos aditivos, la cual utiliza materiales termoplásticos como el PLA, que adquieren una forma semilíquida a temperaturas mayores a 120°C , para que pueda ser extruido depositando capa por capa sobre una plataforma, hasta la construcción del modelo, que se endurece conforme a la temperatura del material disminuye⁽²⁸⁾.

11. Tipos de impresión 3D para biomateriales

El cuadro número 1 muestra los diferentes tipos de impresión 3D existentes para los biomateriales.

Cuadro 1. Tipos de impresión 3D

TIPO	TECNOLOGÍAS	MATERIALES	TÉCNICA DE IMPRESIÓN
Extrusión	Modelado por deposición fundida (FDM)	Termoplásticos (PLA, ABS), metales eutécticos, materiales comestibles.	Materiales que alcanzan temperaturas mayores a 120°C. Mediante un extrusor se van depositando finas capas sobre una plataforma, hasta la construcción del modelo que se endurece conforme la temperatura del material disminuye.
Hilado	Fabricación por haz de electrones (EBF3)	Casi cualquier aleación de metal	
Granulado	Sinterizado de metal por láser (DMLS) Fusión por haz de electrones (EBM) Sinterizado selectivo por calor (SHS) Sinterizado selectivo por láser (SLS) Proyección aglutinante (DSPC)	Casi cualquier aleación de metal Aleaciones de titanio Polvo termoplástico Termoplásticos, polvos metálicos, polvos cerámicos Yeso	Se deposita una capa de polvo, de unas décimas de milímetro, en una cuba que se calienta a una temperatura ligeramente inferior al punto de fusión, seguidamente con un láser sintetiza el polvo en los puntos seleccionados causando que las partículas se fusionen y solidifiquen.
Laminado	Laminado de capas (LOM)	Papel, papel de aluminio, capa de plástico	El laminado en capas se deposita en orden laminar, las capas de material no termo moldeable, como el papel, aluminio o plástico, para la formación del modelo.
Fotoquímicos	Estereolitografía (SLA)	Fotopolímeros y resinas fotosensibles	
Fotopolimerización por luz ultravioleta (SGC)		Fotopolímeros y resinas fotosensibles	Se emplean materiales que polimerizan en contacto con la luz ultravioleta

Modificada de Lr y López Conde^(28,30)

12. Andamios

Son estructuras tridimensionales porosas creadas en condiciones asépticas que aportan un soporte mecánico y una protección física a las células y factores de crecimientos, deben estar compuesta por una matriz biocompatible y reabsorbible que permite una regeneración tisular completa. Constituido fundamentalmente de 3 componentes principales: soporte material, un componente celular y aditivos activos^(31,32).

El andamio debe mantener sus propiedades físicas durante al menos 6 meses mientras tiene lugar la regeneración del tejido, antes de su biodegradación, habitualmente por hidrólisis. Debe mimetizar el entorno del lugar donde será implantado⁽³¹⁾.

13. Biocompatibilidad

La biocompatibilidad es definida como la habilidad que tiene un material para ser aceptado por el huésped, no debe irritar los tejidos circundantes, desencadenar reacciones alérgicas y que no tenga efectos carcinogénicos⁽²⁴⁾.

Hay dos factores que rigen la Biocompatibilidad: la bioseguridad que es excluir los efectos nocivos del biomaterial sobre el organismo, no debe causar infección, inflamación crónica, no debe ser tóxico ni en su forma primaria como en sus productos de degradación y la biofuncionalidad es la necesidad del material de ser capaz de desencadenar una respuesta positiva del organismo receptor para el funcionamiento óptimo del dispositivo médico⁽²²⁾.

13.1 Evaluación de la biocompatibilidad

La biocompatibilidad busca interpretar el grado de aceptabilidad biológica, la interacción puede realizarse tanto del implante hacia el tejido como a la inversa.

- Características físico-químicas como: composición, densidad, microestructura, propiedades termodinámicas y elásticas.
- Características mecánicas como es la elasticidad, resistencia, dureza.
- Banco de pruebas para realizar pruebas de: desgaste, fricción, compresión⁽³³⁾.

La implantación de biomateriales conduce a una reacción inflamatoria que se presenta para evitar daños en el tejido, aislar y eliminar el material extraño y

comenzar el proceso de reparación. Este proceso se denomina reacción de cuerpo extraño (FBR) y se puede dividir en dos fases: aguda y la crónica⁽³⁴⁾.

14. Biodegradabilidad del Ácido Poliláctico

Se conoce como biodegradabilidad a la resistencia de una sustancia al ser descompuesta en los elementos químicos que la componen por la acción de organismos vivos, a mayor biodegradabilidad, mayor descomposición⁽³¹⁾.

La hidrólisis es el proceso responsable del cambio en las propiedades mecánicas del biomaterial polimérico en aplicaciones biomédicas, los polímeros pueden experimentar cambios físicos o químicos. Entre los físicos podemos tener: pérdida de brillo, formación de grietas, pérdida de propiedades mecánicas y en lo químicos: ruptura de cadenas, reacciones de entrecruzamiento, como se observa en la figura 2⁽³¹⁾.

La biodegradación del PLA en el cuerpo es un proceso que se divide en dos fases: La primera es la hidrólisis química del polímero, donde el agua penetra en el objeto biodegradable, hinchándolo y atacando principalmente los enlaces inestables, una vez debilitados, se rompen los enlaces secundarios que unen las cadenas principales y convirtiéndolas en cadenas cortas solubles en agua. La segunda es la activación del metabolismo, en la cual las enzimas de las células de los glóbulos blancos atacan a los fragmentos, degradando el polímero en ácidos naturales, como el ácido láctico y termina fagocitado por los macrófagos. Durante el proceso de la hidrólisis la integridad estructural del material se va afectando a medida que la masa molar disminuye, se observa la progresiva disminución del espesor y un aumento de la fragilidad del material ^(31,35,36).

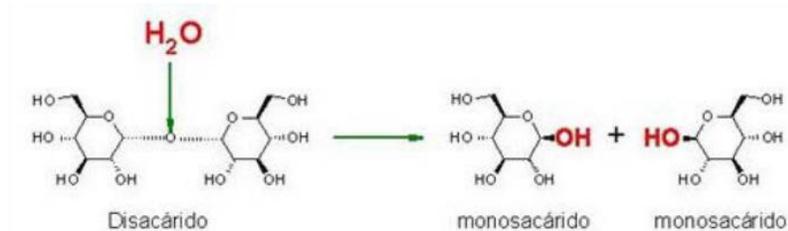


Figura 2. Representación de la hidrólisis de polisacárido – Tomada de (31).

La implantación de biomateriales conduce a una respuesta inflamatoria en la cual el hecho de que no exista un proceso enzimático, realizado por la reabsorción del polímero acarrea una débil reacción de los tejidos, que se limita a una reacción a

cuerpo extraño. Después de solubilización, el ácido láctico se degrada por vía de los lactatos y piruvatos, seguidamente es eliminado en forma de CO₂, esencialmente por vía respiratoria⁽³⁶⁾.

15. Inflamación

Es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo ante agresiones físicas, químicas o biológicas actuando como un mecanismo homeostático y tiene como finalidad adaptar al organismo^(37–39).

15.1 Fisiopatología de la inflamación

La inflamación se caracteriza por la vasodilatación de los vasos sanguíneos locales, con el consiguiente exceso de flujo sanguíneo local, el aumento de la permeabilidad de los capilares, lo que permite la fuga de grandes cantidades de fibrinógeno y otras proteínas, logrando así la migración de granulocitos y monocitos al tejido y la tumefacción de las células tisulares⁽⁴⁰⁾.

Los efectos celulares de la respuesta inflamatoria mencionados en el cuadro 2, coadyuvan a la eliminación de los tejidos dañados, promoviendo el crecimiento de tejidos y combatiendo organismos patógenos, células neoplásicas y antígenos, el organismo desarrolla una respuesta antiinflamatoria eludiendo el desarrollo de los efectos nocivos por sobrestimulación.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

Cuadro 2. Acciones de los principales mediadores de la inflamación

MEDIADOR	FUENTES PRINCIPALES	ACCIONES
<i>DERIVADOR DE LAS CELULAS</i>		
Histamina	Mastocitos, basófilos y plaquetas	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, activación endotelial.
Serotonina	Plaquetas	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular
Prostaglandinas	Mastocitos, leucocitos	Vasodilatación, dolor, fiebre
Leucotrienos	Mastocitos, leucocitos	Aumento de la permeabilidad vascular, quimiotaxis, adherencia y activación de los leucocitos
Factor activador de plaquetas	Leucocitos, mastocitos	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, adherencia leucocitaria, quimiotaxis, desgranulación, explosión oxidativa
Especies reactivas del oxígeno	Leucocitos	Destrucción de los microbios, lesión tisular
Óxido nítrico	Endotelio, macrófagos	Relajación del musculo liso vascular, destrucción de los microbios
Citocinas (TNF, IL-1)	Macrófagos, células endoteliales, mastocitos	Activación endotelial local (expresión de moléculas de adherencia), fiebre, dolor, anorexia, hipotensión, reducción de la resistencia vascular
Quimiocinas	Leucocitos, macrófagos activados	Quimiotaxis, activación de leucocitos
<i>DERIVADOS DE LAS PROTEINAS PLASMATICAS</i>		
Productos del complemento (C5a, C3a, C4a)	Plasma	Quimiotaxis y activación de los leucocitos, vasodilatación
Proteasas activadas durante la coagulación	Plasma	Activación endotelial, reclutamiento de leucocitos

Modificado de (40)

15.2 Clasificación de la inflamación

La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas:

La primera de ellas es una respuesta inflamatoria aguda que consta de una duración corta, va desde unos cuantos minutos hasta unos días de acuerdo a la extensión de la lesión. Ocurre desde que el biomaterial es inoculado y tiene su origen en la lesión de los tejidos (daño estructural del colágeno tipo IV) a partir de los procesos celulares y moleculares reparativos a través de la formación de una matriz provisional que incluye el sangrado inicial, la formación del coágulo de fibrina, el edema y la migración leucocitaria como parte de un proceso de cicatrización en la proximidad del sitio de la lesión. La migración leucocitaria se ve representada en la migración por extravasación de polimorfonucleares neutrófilos y monocitos desde el torrente sanguíneo al sitio que ocupa el biomaterial, inducida por la degranulación y liberación de histamina por parte de mastocitos. De forma específica, el reclutamiento de monocitos desde el torrente sanguíneo para su posterior diferenciación en macrófagos en el tejido conectivo próximo al inoculo se produce en respuesta a factores quimiotácticos como quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, los cuales guían a los macrófagos al sitio del biomaterial, en co-acción con la histamina. En esta fase de la reacción a cuerpo extraño, la migración leucocitaria inicialmente representada en los neutrófilos, se constituye en la característica más importante de la respuesta inflamatoria aguda⁽⁴¹⁾.

Inicialmente los neutrófilos interactúan con las células endoteliales al interior de los vasos sanguíneos para disminuir su velocidad de tráfico, a continuación tiene lugar la adhesión firme de los neutrófilos a la superficie del endotelio a partir de la expresión de integrinas tras la liberación de quimioquinas en la superficie endotelial, su presencia en la superficie endotelial constituye una movilización la cual guía a los neutrófilos a pasar a través del espacio intercelular de dos células endoteliales⁽⁴¹⁾.

Una vez fuera del vaso, los neutrófilos se localizan en el sitio que ocupa el biomaterial para dar inicio a la fagocitosis de antígenos (en este caso el biomaterial). La fagocitosis corresponde a un proceso en el que el neutrófilo / macrófago / células dendríticas, reconocen por medio de receptores, se adhieren y modifican el citoesqueleto para endocitar el antígeno en una vesícula denominada fagosoma, la cual fusiona con los lisosomas para constituir el fago – lisosoma y destruir finalmente al anticuerpo (Ag) por medio de las enzimas lisosomales. Al final del proceso la célula muere por apoptosis⁽⁴¹⁾.

Es importante mencionar que si el Ag resulta en un material extraño más grande que el fagocito, es imposible su fagocitación y así generar un proceso denominado fagocitosis frustrada.

La segunda fase de la inflamación es conocida como una respuesta inflamatoria crónica, la cual es de larga duración limitada a los tejidos adyacentes al biomaterial implantado o inoculado. Ocurre por la presencia constante del estímulo cuando la inflamación aguda no fue resuelta⁽⁴¹⁾.

Se caracteriza por la presencia de monocitos, macrófagos, células plasmáticas, linfocitos y células gigantes en la interfase entre los biomateriales y los tejidos del lugar de implantación o inoculación, asociado a la proliferación de tejido conectivo y la angiogénesis sostenida. Durante el proceso crónico, los monocitos y los macrófagos activados son las células más importantes por el gran número de productos biológicos que producen para estimular la diferenciación y para reclutar las células que van a remodelar histológicamente los tejidos epiteliales y conectivos afectados durante la implantación y a los tejidos conectivos adyacentes al biomaterial⁽⁴¹⁾.

La inflamación consta de varias fases:

1. Liberación de mediadores: Aunque todos los tejidos al lesionarse van a liberar mediadores de la inflamación, la fuente principal es el mastocito, esta es una célula inmune inespecífica que cuando se activa libera mediadores. El mastocito se detecta en casi todos los tejidos, localizados alrededor de pequeños vasos. Otro mecanismo de activación se desarrolla mediante la IgE⁽³⁸⁾.
2. Efecto de los mediadores: Existen mediadores preformados como la histamina, se encuentra ampliamente distribuido por el organismo aunque se detecta principalmente en el mastocito y basófilo. Actúa sobre los receptores de la histamina 1 de los vasos produce vasodilatación e incremento de la permeabilidad. Las enzimas proteolíticas inducen el aumento de la permeabilidad vascular y estimulan las terminaciones nerviosas del dolor⁽³⁸⁾.

La heparina inhibe la coagulación, favoreciendo la llegada al foco inflamatorio desde la sangre de moléculas y células. Una vez liberadas estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio⁽³⁸⁾.

3. Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio van a producir básicamente dos efectos. En la primera fase, alteraciones vasculares que facilitan el trasvase de moléculas desde la sangre al foco inflamatorio, así como la producción de edema. En la segunda fase, las

propias alteraciones vasculares, así como la liberación en el foco de factores quimiotácticos, determinan la llegada de células inmunes procedentes de la sangre y de los tejidos circundantes al foco⁽³⁸⁾.

4. Regulación del proceso inflamatorio, durante este proceso algunos de los mediadores que producen activación van a producir inhibición consiguiendo, de esta forma un equilibrio o modulación de la respuesta inflamatoria⁽³⁸⁾.
5. Reparación. Cuando las causas de la agresión han desaparecido o han sido eliminadas por la respuesta inflamatoria inician los procesos de reparación. Estos procesos integran la llegada a la zona de fibroblastos que van a proliferar y sintetizar colágeno⁽³⁸⁾.

Reguladores del proceso:

1. Mediadores de la inflamación: Histamina, serotonina, bradicina, eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos), quimiocinas, enzimas, factor activador de plaquetas, fibrina⁽³⁹⁾.
2. Citocinas: Son los mediadores más importantes en el inicio de esta respuesta, especialmente el FNT α tempranas o de <<alarma>> y la IL1 β , estas citocinas poseen acción local y general. Actúan sobre las células del estroma, sobre los fibroblastos y el endotelio induciendo una segunda ola de citocinas IL-1, IL-6, IL8 y proteína quimiotáctica generadoras de células en médula ósea, supresoras del proceso^(39,42).

16. Reacción granulomatosa de tipo cuerpo extraño

Todo agente exógeno, orgánico o inorgánico, que cruza la primera barrera de defensa del cuerpo puede provocar una respuesta inflamatoria e inmunológica ante el cuerpo extraño en los tejidos afectados, la cual se ve afectada por las propiedades físicas y químicas del biomaterial. De allí que durante la inoculación, voluntaria o involuntaria de un dispositivo subcutáneo se dé la alteración morfo-funcional inmediata de los tejidos de inicio a un proceso inflamatorio agudo que desencadena una inflamación crónica ⁽⁴¹⁾.

Por lo tanto esta reacción inflamatoria se describe como la formación de un granuloma a partir de la relación que se establece, desde una perspectiva de la respuesta inmune innata, entre las células inmunológicas, la superficie del agente exógeno (biomaterial) y los tejidos adyacentes, representado en la figura 3.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

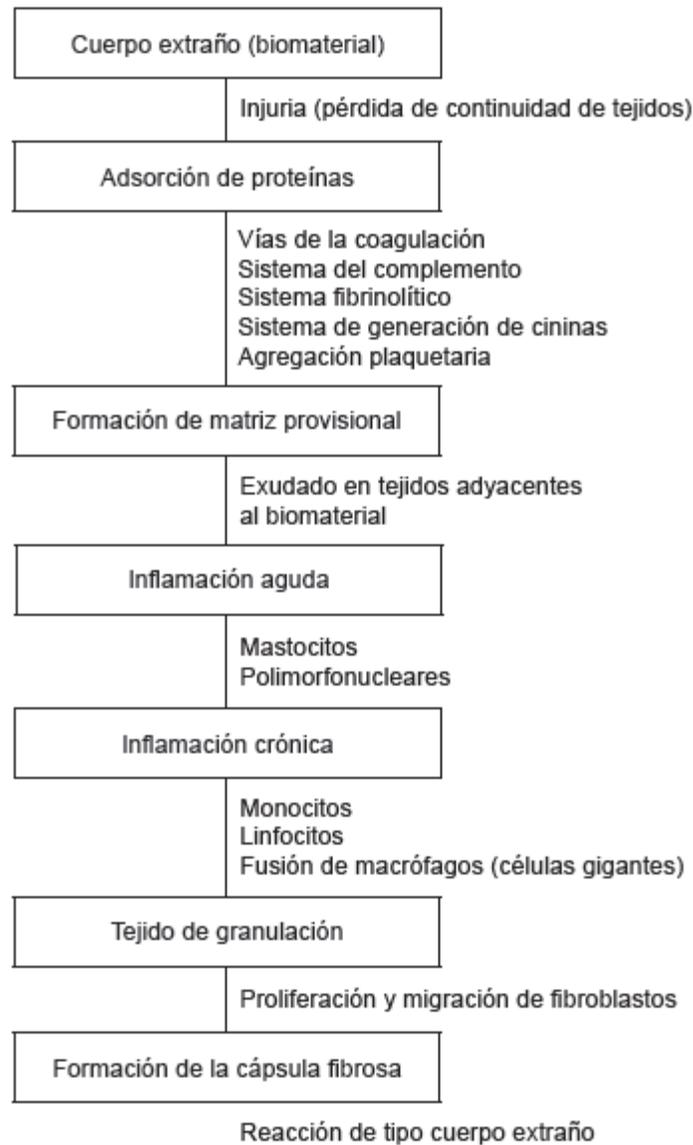


Figura 3. Esquema de los eventos que constituyen la reacción de tipo cuerpo extraño – Tomado de (41).

16.1 Reacción a cuerpo extraño: el caso de los biomateriales

Adsorción de proteínas: en las interacciones biológicas morfo-funcionales de este tipo la sangre y los biomateriales constituyen la primera respuesta del huésped ante la implantación de un biomaterial y la pérdida de continuidad de los tejidos biológicos, lo cual, origina una respuesta inflamatoria inicial que se activa por la

lesión de la vasculatura siguiente a esto se activa a las vías de la coagulación, el sistema del complemento, el sistema fibrinolítico, el sistema de generación de cininas y la agregación plaquetaria⁽⁴¹⁾.

Estos factores favorecen la conformación de agregados de naturaleza trombolítica a partir de los diferentes componentes bioquímicos (agentes mitógenos, factores quimiotácticos, citoquinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento entre otros agentes bioactivos), tisulares (matriz extracelular del tejido conectivo), para dar paso al desarrollo de la cicatrización de la herida (punción por la implantación y penetración de los biomateriales inoculados) y la reacción de tipo cuerpo extraño. Todo esto conocido como efecto Vroman, implica la adsorción de proteínas plasmáticas—albumina, fibrinógeno, complemento, fibronectina, vitronectina y globulina, en la superficie de los biomateriales para conformar una matriz extracelular a partir de fibrina, de tal manera que mientras más rugoso sea el biomaterial más proteínas se adsorben y se favorece la adhesión de células inflamatorias⁽⁴¹⁾.

Luego de la lesión del tejido conectivo durante la implantación, se conduce al desarrollo de una matriz provisional en el lugar del inóculo del biomaterial. Esta matriz consiste en la agregación de fibrina por activación de las cascadas de coagulación y los productos pro- inflamatorios. Con esta red de fibrina se inician los procesos de reparación tisular a partir de la agregación de plaquetas, las cuales producen PDGF y TGF- β para reclutar fibroblastos. La fibrina contribuye con el objetivo de amplificar las respuestas inflamatorias y estabilizar el proceso de cicatrización de la herida junto con fibronectina, trombospondina, factores mitógenos, factores quimiotácticos y citoquinas pro-inflamatorias, estos factores se muestran en la figura número 4⁽⁴¹⁾.

Una vez finalizados los procesos inflamatorios, previamente contextualizados, se conforma un tejido de cicatrización sano, caracterizado por la angiogénesis, la presencia de macrófagos y la infiltración de fibroblastos para síntesis de los componentes de la matriz extracelular y regulación de la contracción de la lesión⁽⁴¹⁾.

En el caso de la implantación o inoculación de biomateriales, la cicatrización final no ocurre debido a que la respuesta de tipo cuerpo extraño se perpetúa, lo que ocasiona que en el tejido de granulación los macrófagos activados diferencien su fenotipo a células epitelioides que se fusionan entre sí para constituir células gigantes de tipo cuerpo extraño, las cuales rodean al biomaterial para constituir un granuloma. La reacción de cuerpo extraño es la vía que toma el tejido de granulación al no resolverse definitivamente la respuesta inflamatoria crónica.

La reacción a cuerpo extraño propiamente dicha es la vía que toma el tejido de granulación al no resolverse definitivamente la respuesta inflamatoria crónica

debido a que los biomateriales no pueden ser fagocitados ni degradados. Al finalizar la respuesta inflamatoria crónica, el tejido de granulación se separa de la interfase entre los tejidos peri – implantares y los biomateriales para constituir un granuloma, el cual cuenta con una matriz extracelular sintetizada por los fibroblastos con fenotipo de mio- fibroblastos reclutados desde los tejidos peri – implantares, al ocurrir la fagocitosis frustrada inicialmente por neutrófilos y finalmente macrófagos, estos últimos adquieren un fenotipo funcional de células epitelioides y empiezan a fusionarse entre sí para constituir células gigantes como un mecanismo de escape a la muerte celular programada⁽⁴¹⁾.

De esta forma en la reacción de tipo de cuerpo extraño los macrófagos y células gigantes multinucleadas persisten en la interfase entre el granuloma y las superficies de los biomateriales durante el tiempo que el inoculo se ha preservado.

Las células gigantes de tipo cuerpo extraño tienen origen en la fusión y multinucleación de los macrófagos derivados de los monocitos en un proceso regulado por la secreción de interferón gamma y la interacción de las integrinas con receptores de manosa y las proteínas adsorbidas por la superficie de los biomateriales. Esto es porque los biomateriales proporcionan un adecuado ambiente bio – mimético que asegura la adhesión, orientación, migración y supervivencia de las células, específicamente de los macrófagos, quienes deben realizar la secreción de citoquinas para iniciar los procesos inflamatorios, deben fusionarse para guiar la reacción de tipo cuerpo extraño y controlar la formación del granuloma.

Las células gigantes de Langhans se caracterizan por tener un número relativamente pequeño de núcleos dispuestos en la periferia del citoplasma en forma de herradura.

En el granuloma inmune las células gigantes de Langhans se forman por la fusión de macrófagos inducidos por linfocitos T CD4+ del perfil Th1 a partir de la expresión de IFN- γ y TNF- α ⁽⁴¹⁾.

La conformación de la cápsula fibrosa es la última respuesta del proceso de cicatrización ante una lesión ocasionada por la implantación subcutánea de un biomaterial. Ante la incapacidad local del organismo de fagocitar o de degradar los biomateriales inoculados, estos últimos son encapsulados para quedar aislados de los diversos factores que generan respuestas inflamatorias y dar paso a un proceso reparativo de los tejidos epiteliales y conectivos afectados del sitio de la lesión a partir de un tejido conectivo denso irregular rico en fibra colágena tipo I y tipo II. La reparación y posterior regeneración de los tejidos que se encuentran adyacentes al biomaterial, pueden presentar diversas respuestas de acuerdo a la extensión de la lesión, a los efectos de biocompatibilidad de los biomateriales y a la capacidad de

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

regeneración de las células que constituyen los tejidos implicados. Esta última se encuentra determinada por el origen de los diferentes linajes de células, los cuales incluyen las células de origen epitelial, epitelios de revestimiento y de epitelios glandulares y de células de origen mesenquimal, fibroblastos, miocitos lisos, endoteliales, osteoblastos entre otras; además de las células permanentes que comúnmente no proliferan postnatal como el caso de las neuronas, miocitos estriados esqueléticos, aunque puedan diferenciarse de las células satélite musculares y miocitos estriados cardiacos. Son las células de primero grupo, que se encargan de la reparación y restitución de la homeostasia de los tejidos y las que, en tal caso de no resolver la lesión por este medio, pueden optar por la conformación de la cápsula fibrosa (fibrosis). Las células del segundo grupo intenten restituir las condiciones de normalidad de los tejidos afectados a partir de respuestas inflamatorias sin llegar a la fibrosis⁽⁴¹⁾.

Principales actividades de los factores de crecimiento durante la cicatrización cutánea.

	Células productoras	Actividad
TGF β	Plaquetas, macrófagos, linfocitos, fibroblastos	Proliferación de los fibroblastos y de las células endoteliales, síntesis de matriz extracelular
PDGF	Plaquetas, queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos	Migración y proliferación de los fibroblastos, síntesis de colágeno. Quimiotáctico para neutrófilos y monocitos
bFGF (FGF2)	Queratinocitos, fibroblastos, plaquetas	Angiogénesis Epitelización
VEGF	Queratinocitos, macrófagos, plaquetas	Angiogénesis
KGF (FGF 7)	Fibroblastos	Migración y proliferación de los queratinocitos
EGF	Plaquetas, queratinocitos, macrófagos	Migración y proliferación de los queratinocitos Proliferación de las células endoteliales y de los fibroblastos

TGF: factor de crecimiento transformante; PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas; bFGF: factor de crecimiento de los fibroblastos básico; EGF: factor de crecimiento epidérmico; KGF: factor de crecimiento de los queratinocitos; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.

Figura 4. Principales actividades de los factores de crecimiento durante la cicatrización cutánea – Recuperada de (43).

II• PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos tiempos se han realizado diferentes investigaciones para regenerar tejidos dañados o perdidos por medio de diferentes biomateriales, uno de ellos es el poliácido láctico (PLA) a pesar de ser estudiado y considerado un material biocompatible, es necesario realizarle pruebas para evaluar su compatibilidad y tiempo de reabsorción debido a que se han realizado andamios con tecnología 3D, manipulando térmicamente al biomaterial.

Los andamios diseñados e impresos con tecnología 3D, se han diseñado para regenerar tejido óseo, perdido o dañado por alguna patología, traumatismo o por enfermedades congénitas, sin embargo al ser andamios que se encuentran en investigación es fundamental realizar pruebas de biocompatibilidad y degradación para poder extrapolar los resultados en un modelo de defecto óseo en animales de experimentación.

Por tal motivo, el presente proyecto tiene la finalidad de evaluar andamios impresos de PLA en 3D para establecer los tiempos de degradación *in vitro* por medio de evaluación de peso, pH, diámetro y pruebas mecánicas a diferentes tiempos de las muestras.

Por otro, lado de manera *in vivo* se evaluó la biocompatibilidad de los andamios en tejido subcutáneo de rata *Wistar*, observando que no exista un rechazo de los mismos.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

III• HIPÓTESIS

H0. Los andamios de PLA impresos en 3D son biocompatibles y biodegradables.

H1. Los andamios de PLA impresos en 3D no son biocompatibles, ni biodegradables.

IV• OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de degradación y biocompatibilidad de los andamios de PLA impresos en 3D a diferentes tiempos.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la estructura del andamio impreso en 3D antes y después de someterlo a pruebas de degradación *in vitro*.
- Comparar la degradación del PLA en diferentes tiempos 20, 60, 100, 140 y 180 días con PBS y agua destilada.
- Evaluar el pH de las soluciones de degradación (PBS y agua bidestilada) a diferentes tiempos (20, 60, 100, 140 y 180 días).
- Comparar el peso y espesor de las muestras sometidas a degradación a diferentes tiempo: 20, 60, 100, 140 y 180 días.
- Comparar el diámetro de las muestras sometidas a degradación a diferentes tiempo: 20, 60, 100, 140 y 180 días.
- Evaluar cambios en las muestras por medio de pruebas biomecánicas.
- Identificar la respuesta tisular a diferentes tiempos (20, 60, 100, 140 y 180 días) al implantar los andamios en tejido subcutáneo de rata *Wistar*.

V• MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Clasificación del tipo de estudio

El tipo de estudio fue: Analítico, experimental, prospectivo y longitudinal.

5.2 Universo de estudio

174 andamios de PLA impresos en 3D

35 ratas macho *Wistar* jóvenes adultos de 250 g del bioterio Central de la Facultad de Medicina de la UNAM.

5.3 Muestra

Para este trabajo se utilizaron 174 andamios de PLA 3D de los cuáles 140 fueron para los estudios *in vitro* y 35 para estudios *in vivo*.

5.4 Criterios de selección

- Criterios de inclusión.
 - Andamios de PLA, impresos en 3D bajo las mismas condiciones y esterilizados por plasma.
 - Ratas machos, *Wistar* de 250g.

- Criterios de exclusión.
 - Andamios dañados por causas independendientes a alguna técnica de impresión y/o esterilización
 - Andamios mal impresos
 - Andamios de PLA no estériles
 - Ratas *Wistar* enfermas, que no cumplan con el peso y edad.
 - Ratas *Wistar* hembras

- Criterios de eliminación
 - Andamios que durante el proceso se hayan roto
 - Ratas que se enfermen por causas ajenas al estudio

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

5.5 Material

Equipo	Insumos		Recursos Humanos	Recursos Animales	Recursos Financieros	Infraestructura
Potenciómetro Bioimpresora	Guantes Cubrebocas Batas Formol al 10% Agua oxigenada y solución estéril	Mango de bisturí #3 Hojas de bisturí 15 Jeringas de 1 ml	Zavala Ayala Karen Stefany (estudiante)	35 ratas macho cepa <i>Wistar</i>	DGAPA-UNAM-PAPIIT-IA205818 responsable Dra. Janeth Serrano Bello	Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos DEPeI, UNAM.
Balanza analítica Vernier milimétrico	Lentes Jabón quirúrgico Xilacina (10mg/kg) Yodopavidona Rasuradora	Espátula 7 A Porta agujas Ketamina (80 mg/Kg) Pinzas Adson con y sin dientes	Dra. Janeth Serrano Bello (Directora)		DGAPA-UNAM-PAPIIT- IT203618-SEP-CONACYT A1-S-9178 responsable Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez	Laboratorio de Patología experimental DEPeI, UNAM.
Microscopio Electrónico de Barrido Histoquinete	Toallas desinfectantes Formol al 10% Balanza Ohaus Adventure	Pinzas Kelly curvas y rectas Agua destilada Bolsas para esterilizar	Mtro. Ricardo Gamaliel González Andrade (Asesor)			Bioterio de la Facultad de Odontología DEPeI, UNAM.
Microscopio óptico Máquina de pruebas universales INSTRON	Campos Cajas jumbo de acrílico con tapa para ratas Frascos contenedores para muestra ámbar Aserrín	Pinzas de curación Tijeras Iris rectas PBS pastillas Gasas Bebederos Sutura Vicryl 3-0 Estufa de cultivo				Instituto de Física, UNAM.
	Alimento estándar para roedor (rodent diet 5001)	Tijeras para sutura Masking tape Polímero sintético, Poliláctico Láctico (PLA)				

Cuadro3. Material, equipo, recursos e infraestructura utilizada

VI. MÉTODO

Primera Fase (*in vitro*)

6.1 Impresión de andamios de poli (ácido-láctico) PLA

Los andamios previamente diseñados, se imprimieron por medio de la técnica modelado por deposición fundida (FDM) capa por capa, con un tiempo de impresión de 5 min, a una velocidad de flujo de 80 mm/s en una bioimpresora Makermax.

6.2 Esterilización de andamios de PLA con plasma de peróxido de hidrógeno (Sterrad).

Las muestras se empaquetaron en bolsas y se esterilizaron a nivel hospitalario en un equipo STERRAD®. El proceso de esterilización se llevó a cabo con un ciclo de 50 minutos, a una temperatura de 50°C. Primero se creó un vacío para eliminar el aire de la cámara, seguido por la inyección del líquido de peróxido de hidrogeno, al aumentar la presión en la cámara se logró el contacto del agente esterilizante y el material, esto crea la rotura de la molécula del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, finalmente la cámara alcanzó la presión atmosférica y se repitió el ciclo una vez más⁽⁴⁴⁾.

6.3 Degradación *in vitro*

Las muestras fueron colocadas de manera individual en 140 frascos ámbar de los cuales 70 tuvieron 51.45 ml de agua bidestilada, considerándola como grupo control y 70 con 51.45 ml de PBS como grupo experimental, todos los frascos estuvieron en una estufa Felissa a una temperatura de 37°C durante 4,10, 20, 60, 100, 140 y 180 días.

Cabe resaltar que la cantidad de agua y PBS se calcularon de acuerdo al volumen de la muestra ⁽⁴⁵⁾.

$$V = \frac{(\pi)(d1)^2(espesor)}{4}$$

$$V = \frac{(3.14)(4.29)^2(1.90)}{4} = \frac{109.79}{4} = 27.44$$

Posteriormente se realiza una regla de tres, como se muestra a continuación:

Muestra–volumen del PBS citado en el artículo.

Volumen de la muestra–ml a ocupar.

Sustituyendo los datos:

16–30 ml PBS

27.44–51.45 ml

6.4 Evaluación de pH

Se evaluó por medio de un potenciómetro el pH de las soluciones, tanto control como experimental, a diferentes periodos de tiempo desde, el inicial antes de colocar las muestras y posteriormente a 4, 10, 20, 60, 100, 140 y 180 días; los datos obtenidos se registraron en tablas de datos (Anexo D, H).

6.5 Evaluación del espesor, diámetro y peso

Los andamios fueron pesados antes de meterlos a las soluciones, posteriormente se pesaron en cada periodo de tiempo establecido (4, 10, 20, 60, 100, 140 y 180 días), para lo cual, los andamios se retiraban de las soluciones y se colocaban en un desecador durante 45 para asegurar que las muestras estuvieran libres de humedad, los datos se registraron en tablas de datos.

El espesor y el diámetro de las muestras se midió con un Vernier electrónico, cada periodo de tiempo establecido. Los datos se registraron en tablas de datos.(Anexo A-C, E-G).

6.6 Pruebas mecánicas

Las pruebas mecánicas se realizaron en el Laboratorio de Materiales Dentales (DEPeI) usando la máquina de pruebas mecánicas universales (INSTRON® 5567), a una velocidad de 1mm/min en modalidad de compresión.

Cabe señalar que las muestras previamente se desecaron en un vaccum durante 45 min para garantizar que estuvieran libres de humedad, los datos se registraron en tablas de datos (Anexos I–R)

Las propiedades a evaluar fueron: elasticidad y resistencia.

6.7 Evaluación de la estructura superficial de los andamios de PLA por MEB

Las estructuras superficiales de los andamios de PLA fueron evaluados mediante Microscopía Electrónica de Barrido en el Instituto de Física. Sometiendo los andamios en un Sputtering , creando un vacío en las muestras para ser recubiertas por oro; con la finalidad de que el material funcionará como un conductor y de esta manera poder observar por el haz de electrones del microscopio (SEM 5600), trabajando a una distancia de 20 mm y una tensión de aceleración de 10 kV; posteriormente se colocaron en un soporte de plástico, se introdujeron en la cámara de muestras del MEB para evaluar si las dos soluciones que usamos modificaban

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

la estructura superficial de los andamios. Finalmente, a través del software ImageJ[®] se midieron las fibras de PLA.

En la figura 5 se muestra un resumen de los procedimientos *in vitro*.



Figura 5. Fase *in vitro*. (A)- (B) Impresión de andamios 3D (C) Andamios de PLA (D) - (E) Frascos ámbar previamente marcados, colocados en estufa Felissa (F) Máquina Instron, prueba de compresión (G) Andamios de PLA procesados para crear vacío y bañarlos en nano partículas de oro (H) - (I) Andamios de PLA recubiertos con nano partículas de oro—Fuente directa.

Segunda Fase (*in vivo*)

Se utilizaron 35 ratas macho *Wistar* de 250 g, las cuales se separaron de manera aleatoria para conformar 5 grupos, a los cuales se les colocó una muestra (andamio) y se evaluaron a diferentes tiempos, 4, 10, 20, 60, 100, 140, 180 días.

Siguiendo los parámetros de las siguientes normas oficiales de México las cuales regulan el uso y bienestar de los animales de laboratorio.

6.8 Procedimiento quirúrgico con ratas macho *Wistar*

Las ratas fueron sedadas con Ketamina (80mg/kg) y Xilocaína (10mg/kg) por vía intramuscular. Posteriormente se rasuró el lomo de la rata, realizando antisepsia de rutina, se hizo una incisión lineal de 3 cm para formar una bolsa, posteriormente se colocó la muestra de PLA de manera subdérmica, en la parte superior derecha del lomo. Finalmente se suturó el tejido con vicryl de 3-0.

Se realizaron seguimientos postquirúrgicos, valorando el estado general del animal, aspecto de la herida, presencia de sangrado, exudado, colecciones o extrusión de los andamios.

Los procedimientos quirúrgicos y el cuidado de las ratas, se realizó en la Unidad de Bioterio de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, los cuales contaron con un fotoperiodo de 12 h, a una temperatura de 22°C y humedad relativa a 50%, siendo su alimentación (Roodent diet 5001) y agua *ad libitum*.

El proceso quirúrgico realizado a las ratas macho *Wistar* se muestra de manera gráfica en la figura número 6.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

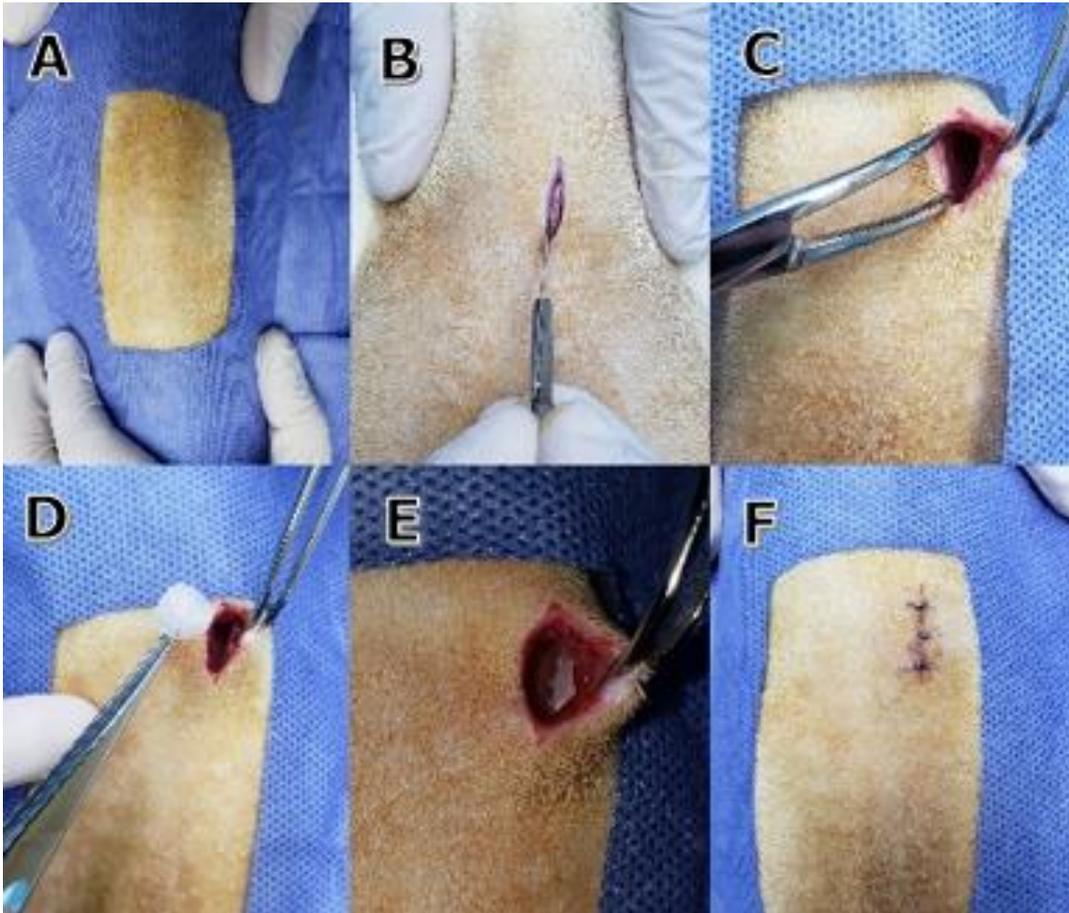


Figura 6. Procedimiento quirúrgico en modelo animal. (A) Asepsia del modelo animal (B) Incisión subcutánea en el modelo animal (C) Debridación de los tejidos (D) Colocación del andamio de manera subdérmica (E) Andamio en el modelo animal (F) Sutura con nylon 3-0 – Fuente directa

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

6.9 Recuperación de la muestra

6.9.1 Evaluación de la respuesta inflamatoria

35 ratas *Wistar* se sacrificaron mediante sobredosis de cloroformo hasta llegar al paro cardiorrespiratorio. Posteriormente se cortó la zona experimental (lomo de la rata) donde se colocaron los andamios de PLA realizando el corte de la periferia con un margen de seguridad de 4mm y se colocaron en formol al 10% durante 24 horas para su fijación y posteriormente realizar el procesado histológico en el Laboratorio de Patología Experimental (DEPeI) Facultad de Odontología UNAM.

6.10 Evaluación Histológica

Las muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para su evaluación en microscopía óptica, los parámetros que se tomaron en cuenta fueron el grado de inflamación (leve, moderado y severo), el conteo de células gigantes de cuerpo extraño en cuatro campos con un aumento de 20x y medición de formación de cápsula (mínimo y máximo), a través del software del microscopio.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

VII. VARIABLES

Variables Dependientes			
Variable	Definición operacional	Escala de medición	Categoría
pH	Coeficiente que mide la acidez o basicidad de una solución acuosa.	Cualitativo ordinal Cuantitativo	Ácido Base Neutro
Respuesta tisular en tiempo	Efectos en los tejidos secundarios a la implantación de andamios	Cualitativa nominal	Descriptiva
Estructura superficial	Evaluación de la estructura fibrilar de los andamios por MEB	Cualitativa nominal	Descriptiva
Peso	Peso de un cuerpo por unidad	Cuantitativa	Continua
Espesor	Dimensión más pequeña de un cuerpo de tres dimensiones	Cuantitativa	Continua
Diámetro	Anchura de un objeto en forma circular	Cuantitativo	Mm µm
Estructura	Disposición y orden de las partes dentro de un todo	Cualitativa	Buena Regular Mala
Grado de inflamación	Estado de variación dentro del proceso de inflamación	Cualitativa ordinal	Leve Moderado Severo

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

Variables Independientes			
Variable	Definición operacional	Escala de medición	Categoría
Andamios de PLA	Muestra obtenido de material sintético polimérico impreso en 3D	Cualitativa nominal	Bueno Malo
PBS	Solución salina a base de agua que contiene hidrógeno fosfato disódico, cloruro de sodio.	Intervalo continua	Correcta Incorrecta
Tiempo	Periodo determinado en el cual se realiza una acción	Intervalo continua	Correcta Incorrecta
Agua bidestilada	Sustancia líquida, incolora e insabora	Intervalo continua	Correcta Incorrecta

VIII• DISEÑO ESTADÍSTICO

Los resultados fueron evaluados de manera estadística por medio de ANOVA en el programa Prism 6, tomando en cuenta un valor de $p \leq 0.05$ para considerarlo estadísticamente significativo.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

IX• ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

Se realizaron los procedimientos quirúrgicos y los cuidados de los animales siguiendo los parámetros de las normas:

NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio ⁽⁴⁶⁾.

NOM-029-ZOO-1995. Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoosanitaria⁽⁴⁷⁾.

NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres ⁽⁴⁸⁾.

NOM-046-ZOO-1995. Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica⁽⁴⁹⁾.

NOM-051-ZOO-1995. Trato humanitario en la movilización de animales⁽⁵⁰⁾.

Así mismo los procedimientos establecidos por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Los estudios fueron realizados bajo el Comité Interno para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), con número 027- CIC- 2019.

X• RESULTADOS

10.1 Resultados *in vitro*

10.1.1 Evaluación de peso

Los resultados indican que el grupo experimental tiene un peso inicial de 0.065 g y el grupo control de 0.062g, en la figura 7 se observa que el grupo experimental mantiene su peso hasta los 60 días, sin embargo a partir del día 100 disminuye a 0.050g, manteniéndose así hasta los 180 días, en contraste con el grupo control el cuál mantuvo el peso del inicio hasta los 60 días y a partir del día 100 aumento a 0.072 g y terminando a los 180 días con un peso de 0.075g. (Anexo A, E)

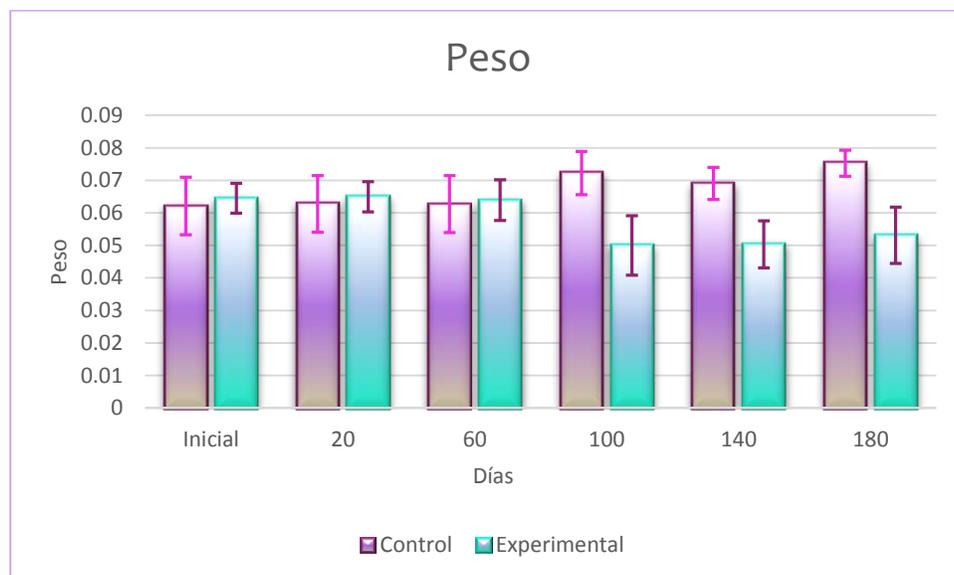


Figura 7. Resultados de la evaluación de peso del grupo control y grupo experimental.

10.1.2 Evaluación de diámetro

En la figura 8, se muestra una gráfica comparativa del diámetro entre el grupo experimental y el grupo control, teniendo un diámetro inicial de 6.702 mm y 6.502 mm respectivamente, el grupo experimental disminuyó con el tiempo para los 20 días tenía un diámetro de 6.592mm y para los 60 días, 6.510 mm, contrastando a los 100 ya que aumento de manera considerable a 8.560 mm, disminuyendo nuevamente a los 140 días (8.448mm) y aumentando a los 180 con un diámetro de 7.605.

Respecto al grupo control su comportamiento fue similar al experimental hasta el día 100, a los 140 días tuvo un ligero aumento (8.656mm) el cual a los 180 días disminuye a 6.378 mm. (Anexo B, F)

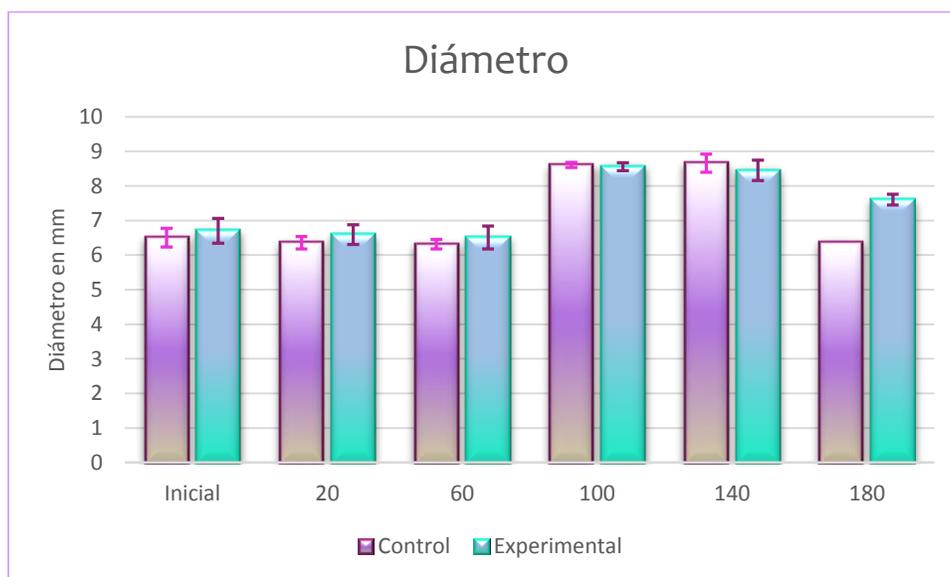


Figura 8. Resultados de la evaluación de diámetro del grupo control y grupo experimental.

10.1.3 Evaluación de espesor

En la figura 9, se observa la gráfica de espesor, en el grupo experimental aumenta a los 20 días de 1.83 mm a 1.97mm, posteriormente el espesor disminuye de los 60 a los 140 días, aumentando ligeramente a los 180 (1.77mm, 1.75mm, 1.06mm, 1.81mm, respectivamente). Con respecto al grupo control el comportamiento es diferente, ya que disminuye a los 20 y 60 días y contrastando a los 100 días que obtiene el valor inicial del espesor, el cual disminuye nuevamente a los 140 días (1.78mm) y aumenta nuevamente a los 180 días con un valor de 1.85mm. (Anexo C, G)

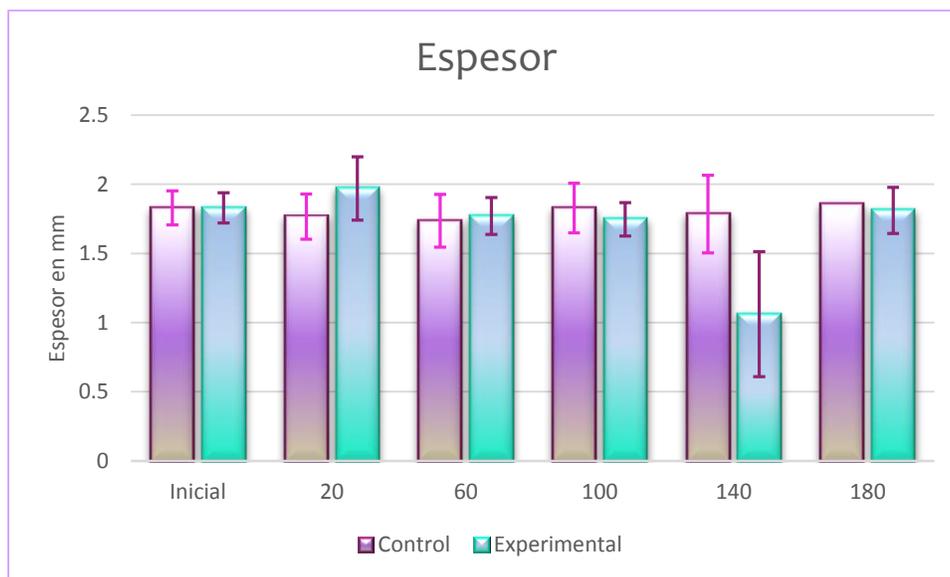


Figura 9. Resultados de la evaluación de espesor del grupo control y grupo experimental.

10.1.4 Evaluación de pH

El pH inicial promedio para el agua bidestilada fue de 6.68 y para el PBS de 7.35, en la figura 10 se observa que el pH en la solución experimental aumento al 7.37 al día 20, posteriormente al día 60 y 100, se mantuvo en un pH de 7.42, posteriormente la tendencia fue en aumento ya que a los 140 días el pH fue de 7.53 y de 7.55 a los 180 días. En contraste con el grupo control, el pH aumento de manera significativa a 7.29 para el día 20 continuando la tendencia hasta el día 100, (7.74 y 7.82 respectivamente), posterior a este periodo de tiempo la tendencia fue a la inversa, ya que a los 140 días disminuyo el pH a 7.60 y a 7.59 para el día 180. (Anexo D, H)

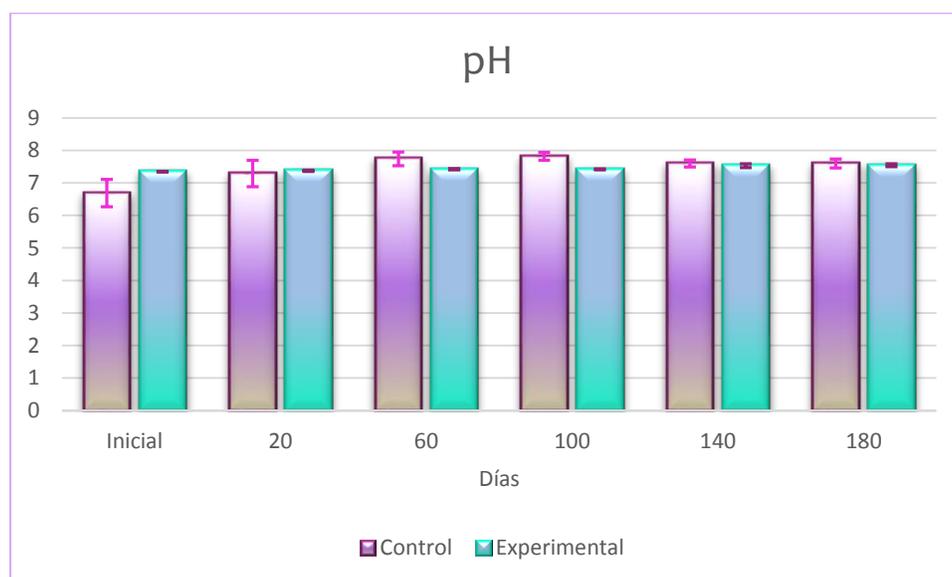


Figura 10. Resultados de la evaluación de pH del grupo control y grupo experimental.

10.1.5 Resultados de las pruebas mecánicas

(Anexo I-Anexo R) Los resultados del comportamiento del módulo de elasticidad de las muestras de PLA, las cuales fueron sometidas a compresión a diferentes tiempos después de estar en contacto con el agua bidestilada y PBS.

Al ser comparados los andamios de ambos grupos, se observó que tanto el grupo control como el experimental muestran una similitud de degradación a partir del día 0 al día 100, posterior al día 100 el grupo experimental muestra una mayor degradación y rigidez de manera gradual. Siendo el día 140 en el que la rigidez crece de manera exponencial, infiriendo que el PBS pudo formar lactato de sodio, siendo los iones de calcio el precursor para dar la dureza al andamio de PLA.

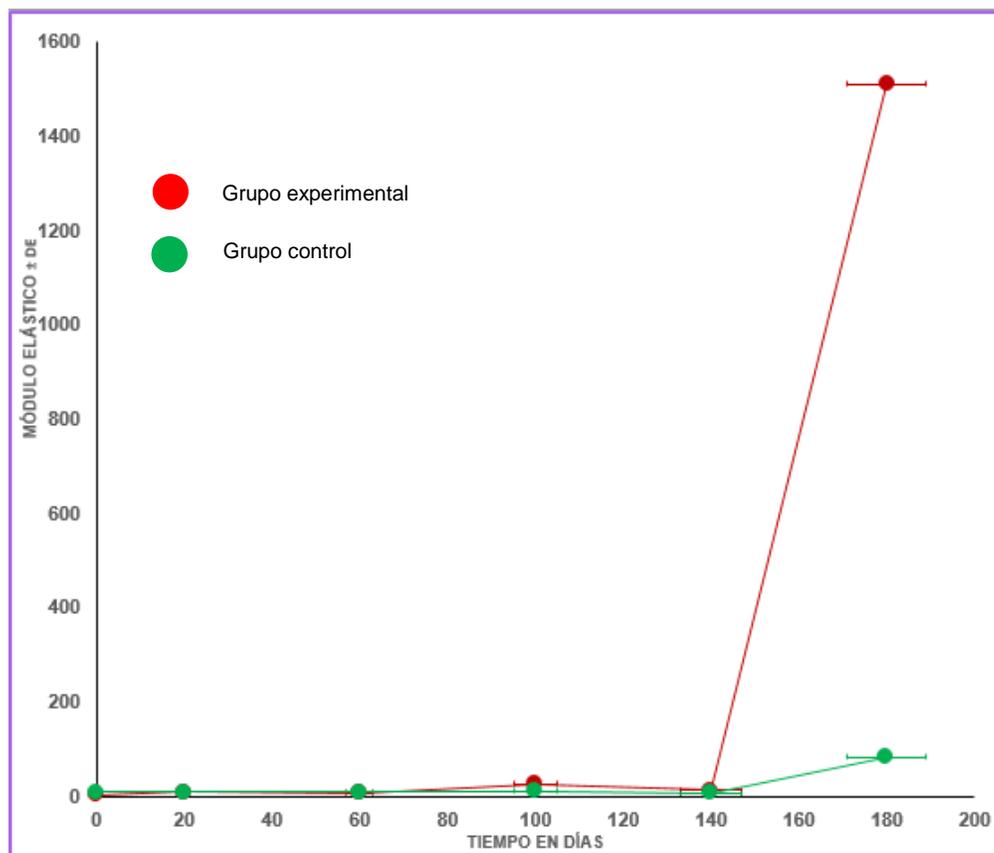


Figura 11. Resultados del promedio general del grupo experimental y control.

10.1.6 Evaluación de estructura superficial de los andamios de PLA por MEB

Se obtuvieron imágenes por microscopía electrónica de barrido de las muestras de PLA, desde el día cero (antes de sumergir los andamios en las soluciones) hasta los 180 días, tanto experimentales, como controles, en la figura 12, se muestran imágenes representativas de cada periodo de tiempo; donde se puede observar que la muestra inicial de PLA del grupo control, presenta una curvatura simétrica y una mayor compactación entre las fibras, de igual manera en el andamio inicial experimental, se observan las fibras de una manera homogénea y sin modificaciones en la superficie de cada una de las fibras.

A los 20 días las muestras control presentan ligeras deformaciones y rupturas de fibras de PLA principalmente en la continuidad de la curvatura, en las imágenes del grupo experimental las fibras se observan ligeramente más estrechas, con ligeras deformaciones, sin embargo, se observan con mayor homogeneidad.

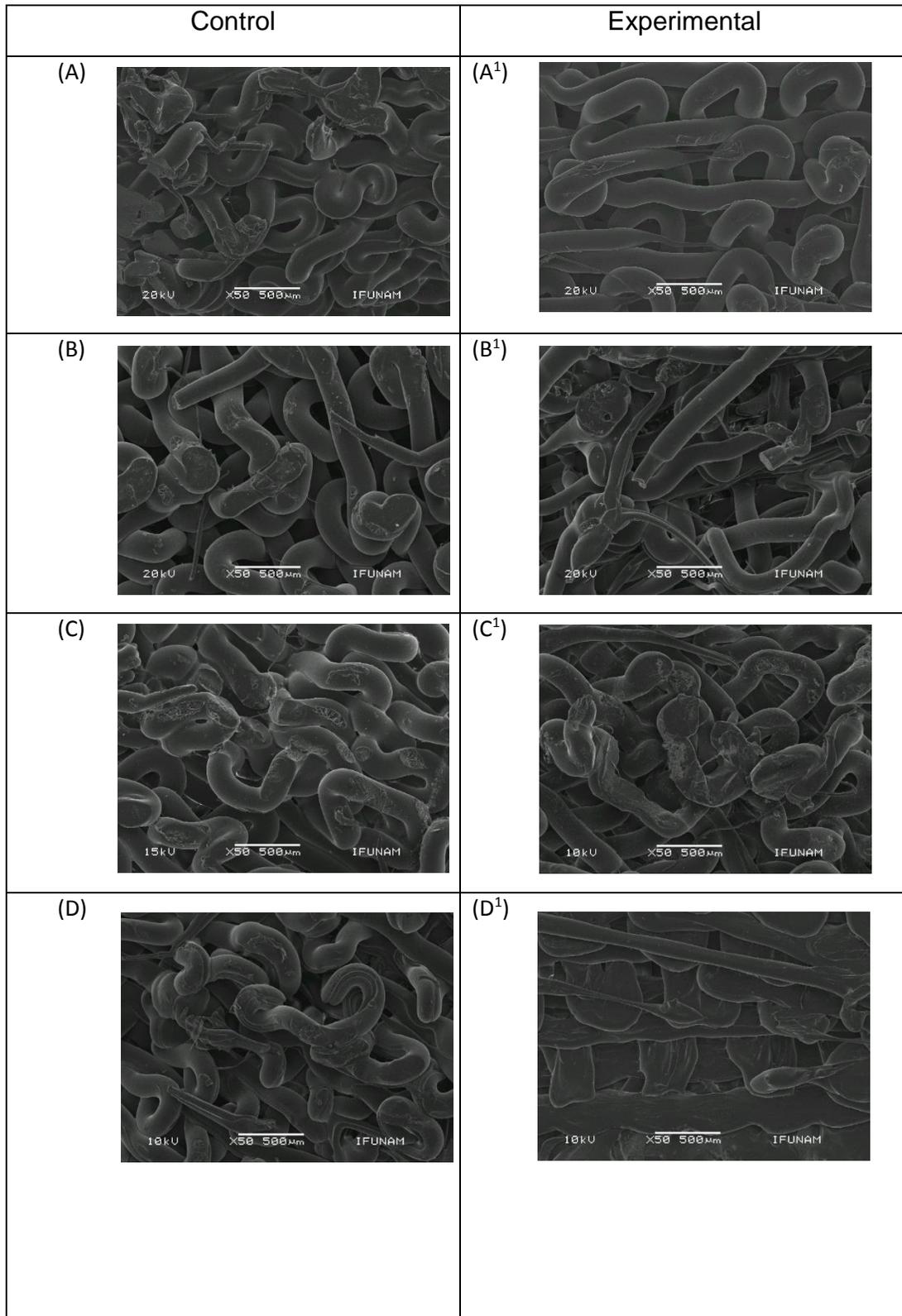
A los 60 días las fibras del grupo control se observan con pequeñas deformaciones y desgaste, en el grupo experimental las fibras presentan pequeños adelgazamientos.

A los 100 días en el grupo control se observan deformaciones en la superficie de las fibras, así como acortamiento de las mismas. En el grupo experimental se observa adelgazamiento de las fibras, así como rugosidades en las mismas.

A los 140 días se observa en el grupo control un acortamiento de las fibras, así como deformaciones, en el grupo experimental se observa de igual manera acortamiento de las fibras, así como rugosidades en la estructura superficial de las fibras.

A los 180 días en el grupo control se observa un mayor acortamiento de las fibras y adelgazamiento, así como deformaciones en su estructura. En el grupo experimental se observa un acortamiento de las fibras, así como fracturas, en la superficie se observa pequeños cúmulos densos radiodensos posiblemente de sales.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.



Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

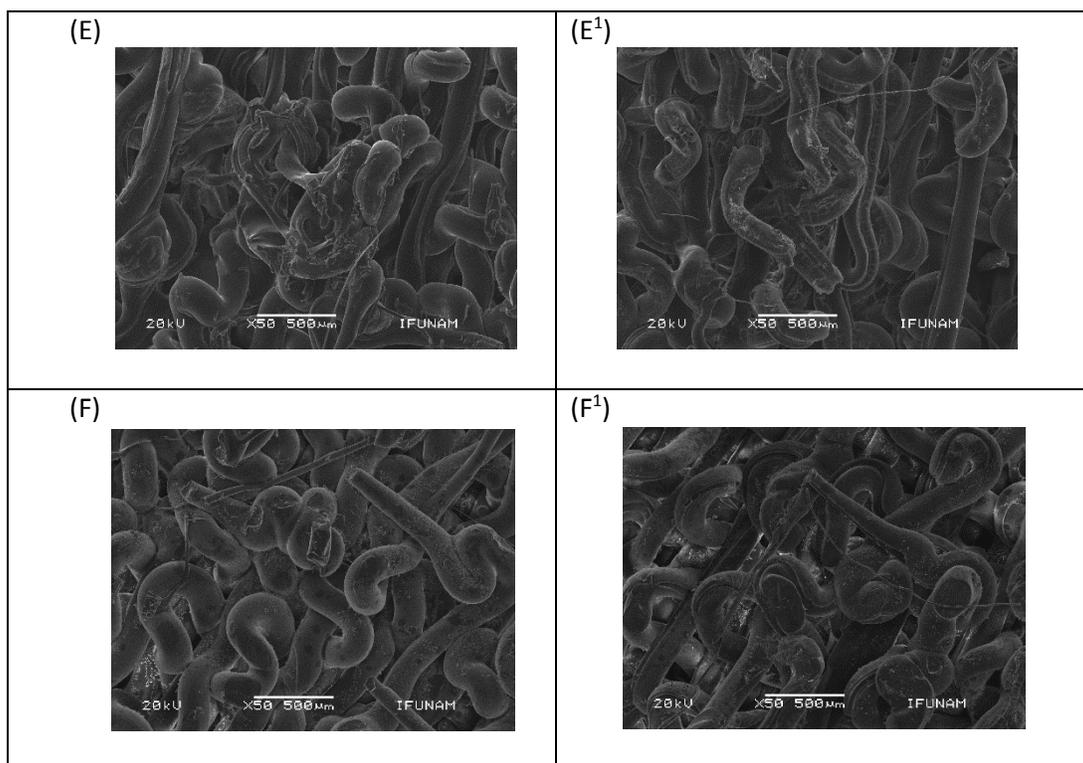


Figura 12 Fotomicrografía de microscopía electrónica de barrido (MEB) a 50 aumentos y 20kV de andamios de PLA **(A)** inicial perteneciente al grupo control. **(A¹)** Inicial perteneciente al grupo experimental. **(B)** Andamios de PLA del grupo control a los 20 días. **(B¹)** Andamios de PLA a los 20 días pertenecientes al grupo experimental. **(C)** Andamios de PLA a los 60 días pertenecientes al grupo control. **(C¹)** Andamios de PLA a los 60 días pertenecientes al grupo experimental. **(D)** Andamios de PLA a los 100 días pertenecientes al grupo control. **(D¹)** Andamios de PLA a los 100 días pertenecientes al grupo experimental. **(E)** Andamios de PLA a los 140 días pertenecientes al grupo control. **(E¹)** andamios de PLA a los 140 días pertenecientes al grupo experimental. **(F)** Andamios de PLA a los 180 días pertenecientes al grupo control. **(F¹)** Andamios de PLA a los 180 días pertenecientes al grupo experimental.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

Mediante el software Image J© se midió el diámetro de las micro y nanofibras de las muestras experimentales y controles de PLA, con lo cual se determinó el diámetro promedio de dichas fibras.

En la figura número 13 se observa en el grupo control la presencia de 13 nanofibras de PLA obtuvieron un rango entre 151- 200 μm , en comparación al grupo experimental que 8 de ellas obtuvieron un rango entre 151-200 μm y 201-250 μm , como se muestra en la figura 13.

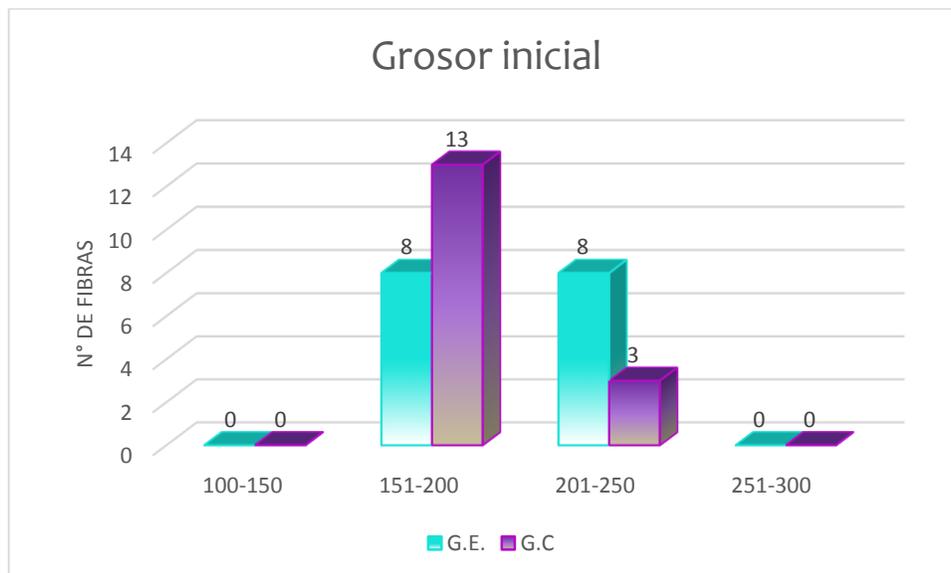


Figura 13. Resultados de grosor inicial

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

En la figura 14 se observan los resultados del grosor de las nanofibras de PLA a los 20 días, en el grupo control se observan 13 fibras con un rango de 201-250 μm . En contraste con el grupo experimental, se observan 9 nanofibras en el rango 100-150 μm .

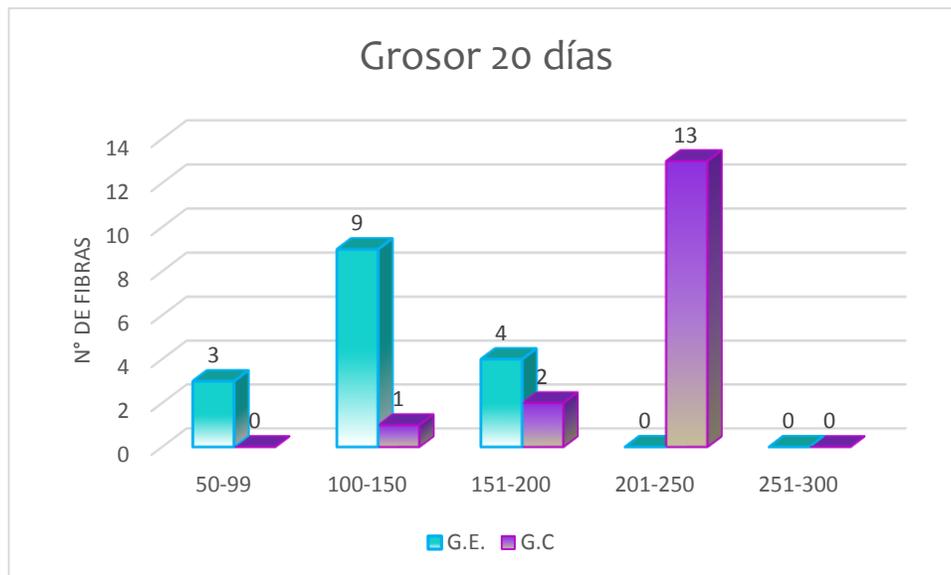


Figura 14. Resultados del grosor a los 20 días

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

En la figura 15, en el grupo control, se observan 10 nanofibras con los rangos 201-250 μm , en contraste al grupo experimental se observan 8 fibras con el rango 151-200 μm .

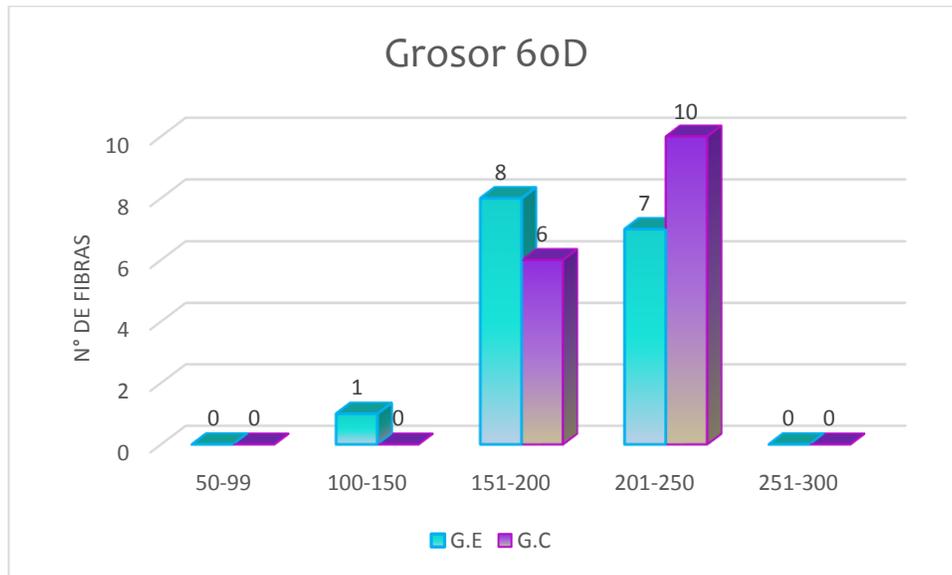


Figura 15. Resultados del grosor a los 60 días

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

A los 100 días en el grupo control en el rango de 151-200 μm se encuentran 13 nanofibras. Mientras que en grupo experimental en el rango de 100- 150 μm se encuentran 4, en este rango, es donde se encuentran más, observando que en este periodo de tiempo las fibras son de diferente tamaño (Figura 16).

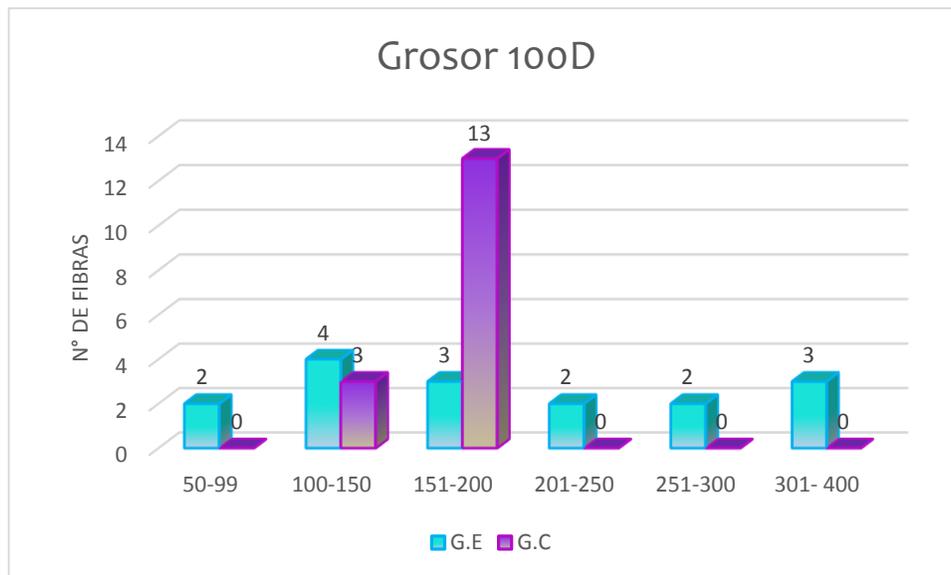


Figura 16. Resultados de la longitud a los 100 días

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

En la figura 17 se muestra el grosor a los 140 días del grupo control y experimental, 14 y 9 nanofibras respectivamente en el rango de 151-200 μm .

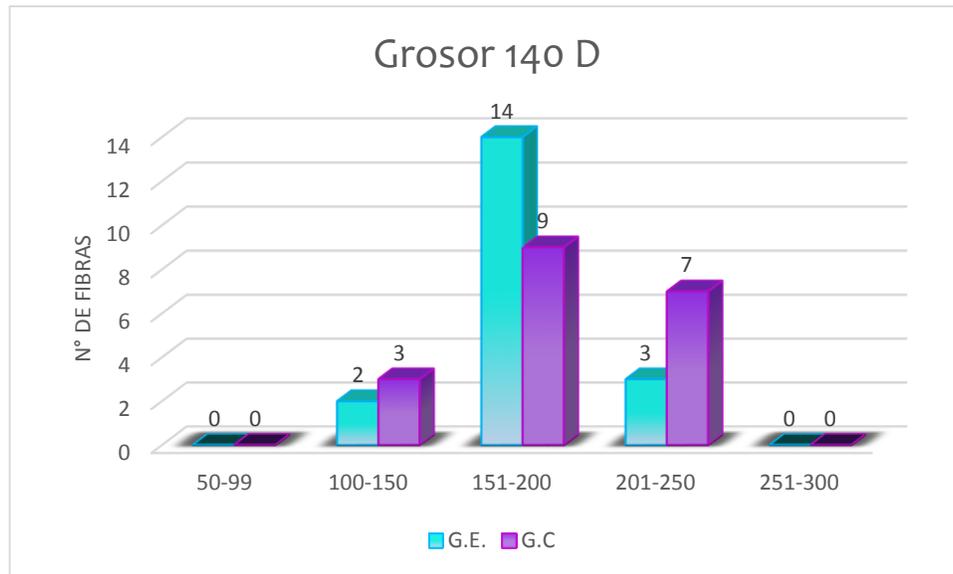


Figura 17. Resultados del grosor a los 140 días

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

En la figura 18 se observan 9 nanofibras en el rango 201-250µm correspondientes al grupo control y 10 nanofibras en el rango 151-200µm en el grupo experimental.

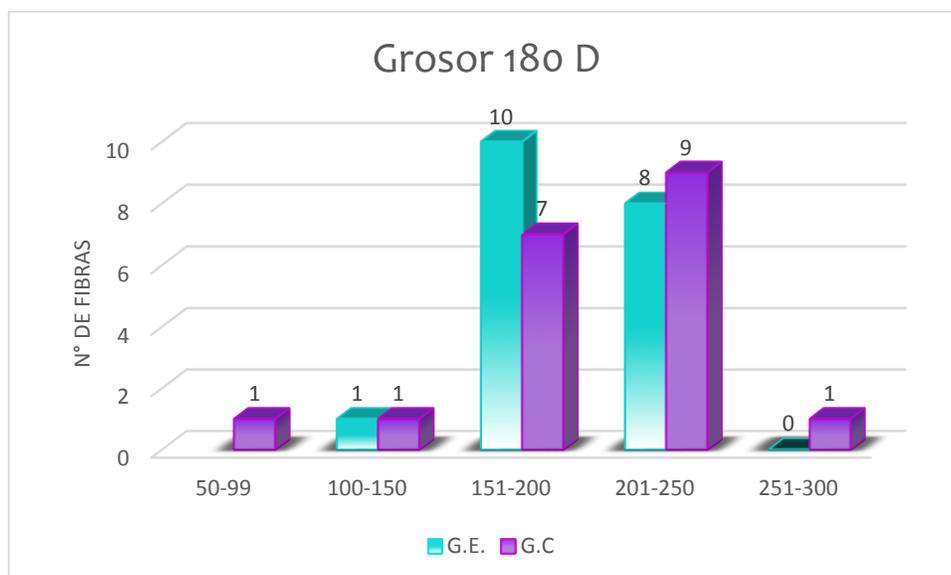


Figura 18. Resultados del grosor a los 180 días

10.2 Resultados *in vivo*

10.2.1 Evaluación histológica de la respuesta inflamatoria en tejido subcutáneo en ratas Wistar.

Con la finalidad de comprobar la biocompatibilidad de los andamios, se realizaron pruebas de los mismos en tejido celular subcutáneo de ratas *Wistar*, a diferentes tiempos (4, 10, 20, 40, 60, 100, 140 y 180 días).

Una vez que se cumplieron los tiempo experimentales se realizaron biopsias excisionales donde se encontraba la muestra, la cual se procesó de manera histológica y se tiñó con H&E para su evaluación, los parámetros a considerar fueron grado de inflamación, presencia de células gigantes de cuerpo extraño, así como grosor de la cápsula (mínimo y máximo).

En la figura 19 se observan foto micrografías representativas de cada periodo de tiempo; a los 4 días se observa la presencia de infiltrado inflamatorio agudo alrededor de la luz (zona del andamio), con presencia leve de células gigantes de cuerpo extraño.

A los 10 días se puede observar presencia de infiltrado inflamatorio crónico con escasas células de gigantes de cuerpo extraño, así como la formación de vasos sanguíneos, de pequeño y grande calibre.

A los 21 días se observa que el infiltrado inflamatorio ha disminuido, así como las células gigantes de cuerpo extraño. Se observa la formación de vasos sanguíneos.

A los 60 días se observa la formación de vasos sanguíneos, así como fibras de colágena desorganizada. A partir de este periodo de tiempo, hasta los 180 días ya no se observa la presencia de células gigantes de cuerpo extraño.

A los 100 días podemos observar la formación de colágena desorganizada y la formación de pequeños vasos sanguíneos.

A los 140 y 180 días se observa colágena desorganizada, formación de vasos sanguíneos, ya no existe presencia de infiltrado inflamatorio ni de células gigantes de cuerpo extraño.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

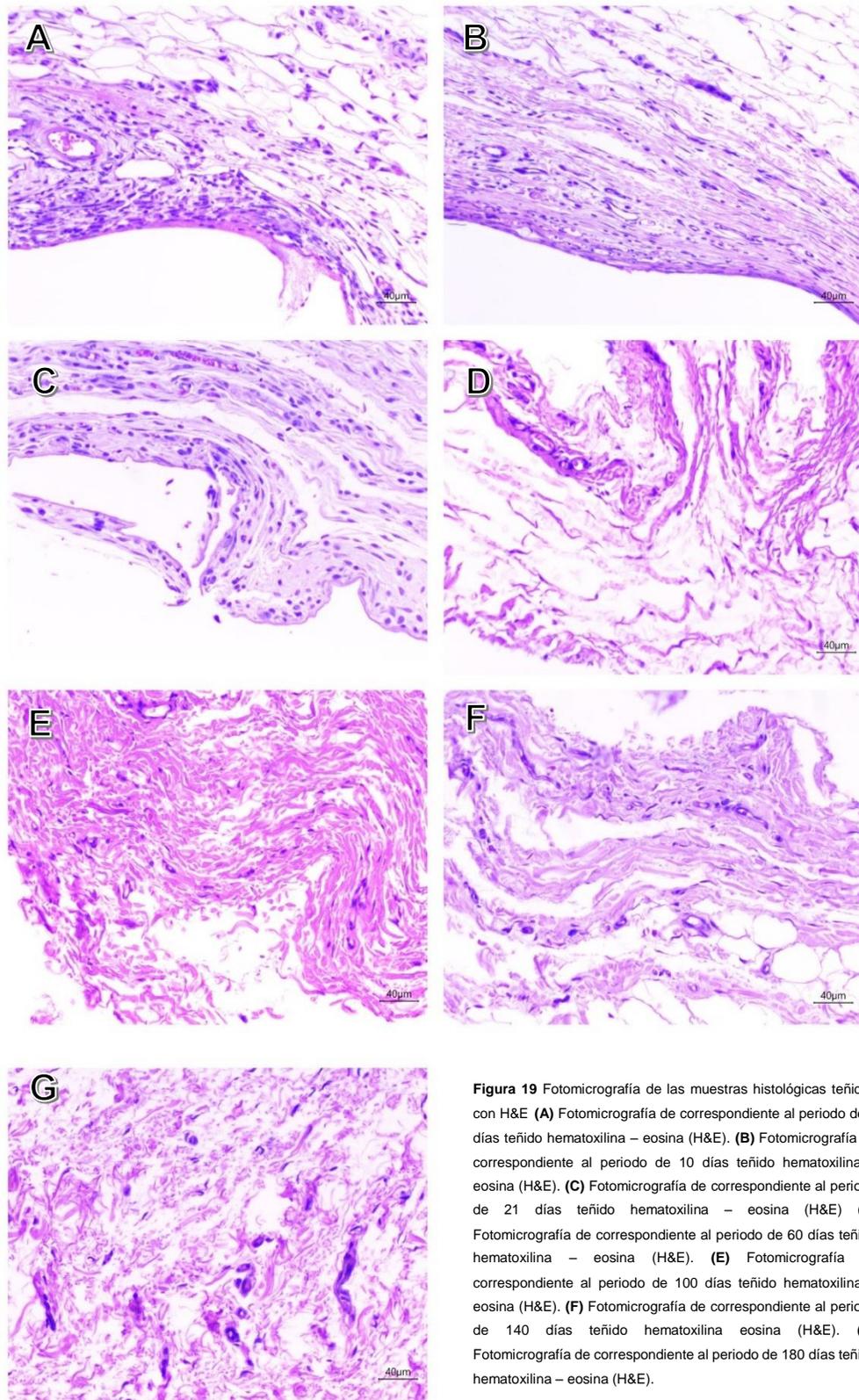


Figura 19 Fotomicrografía de las muestras histológicas teñidas con H&E **(A)** Fotomicrografía de correspondiente al periodo de 4 días teñido hematoxilina – eosina (H&E). **(B)** Fotomicrografía de correspondiente al periodo de 10 días teñido hematoxilina – eosina (H&E). **(C)** Fotomicrografía de correspondiente al periodo de 21 días teñido hematoxilina – eosina (H&E) **(D)** Fotomicrografía de correspondiente al periodo de 60 días teñido hematoxilina – eosina (H&E). **(E)** Fotomicrografía de correspondiente al periodo de 100 días teñido hematoxilina – eosina (H&E). **(F)** Fotomicrografía de correspondiente al periodo de 140 días teñido hematoxilina eosina (H&E). **(G)** Fotomicrografía de correspondiente al periodo de 180 días teñido hematoxilina – eosina (H&E).

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

En el día 4 se observa que el grosor mínimo de la cápsula es de 22.466 μm , el cuál fue aumentando de los 10 a los 21 días (64.688 μm , 92.027 μm respectivamente), posteriormente a los 60 días disminuyó considerablemente registrando 43.44 μm , para los días 100, 140 y 180 no se registra la formación de cápsula (Figura 20).

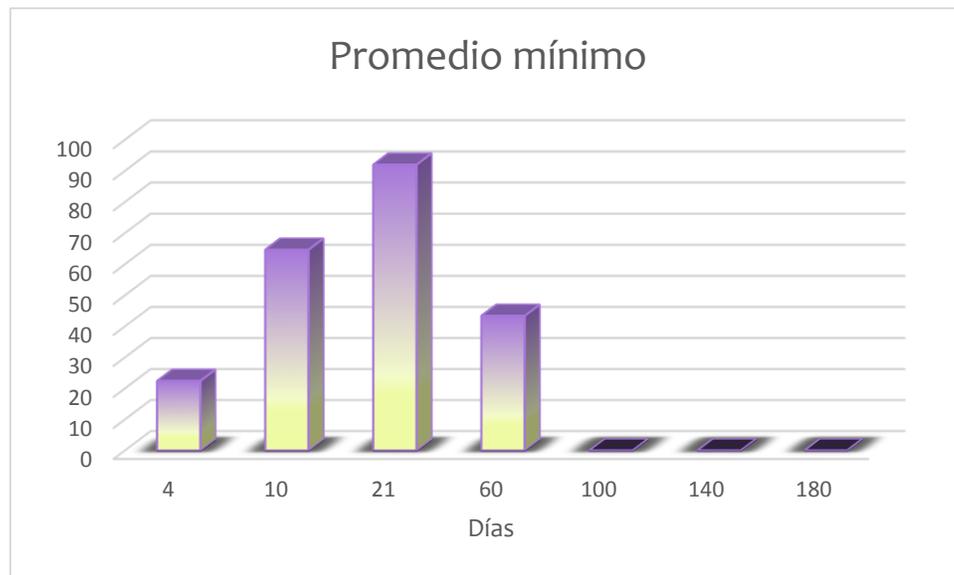


Figura 20 Gráfica del promedio mínimo de la formación de cápsula.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

El grosor máximo se comportó de la misma manera que el grosor mínimo, a los 4 días el valor fue de 59.948 μ m aumentando hasta los 21 días (103.616 μ m, 200.895 μ m respectivamente) a los 60 días el grosor de la capsula disminuyó considerablemente a 157.45 μ m y para los 100, 140 y 180 no se registró la formación de capsula alrededor del andamio (Figura 21).

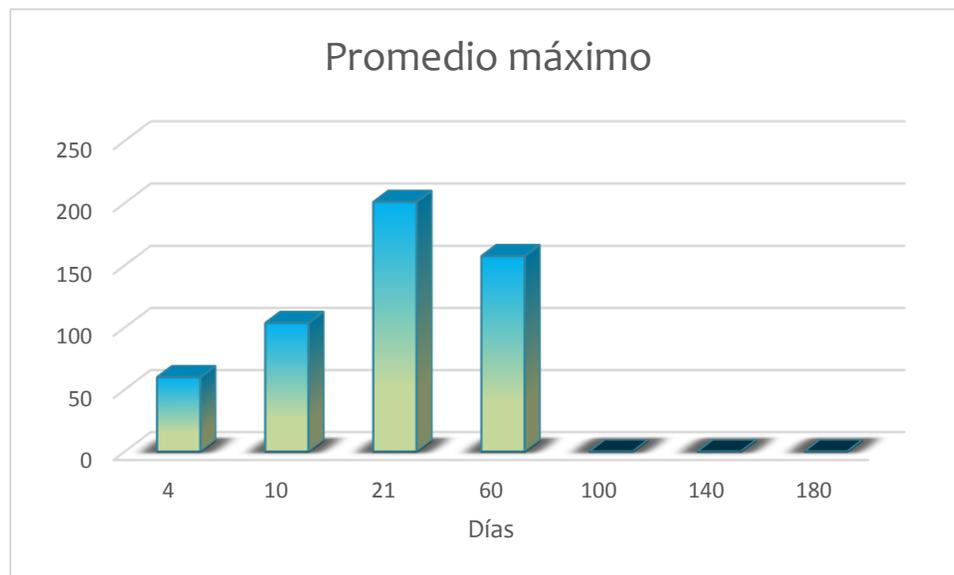


Figura 21 Gráfica del promedio máximo de formación de capsula.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

Las células gigantes de cuerpo extraño que se formaron alrededor del andamio fueron cuantificadas por campos, a los 4 días se observa en promedio un total de 2 células gigantes de cuerpo extraño por todos los campos observados, aumentando mínimamente a los 10 días con un promedio de 2.5 células gigantes de cuerpo extraño, observando a los 21 días únicamente 1.5 células gigantes de cuerpo extraño, por todos los campos. Del día 60 al día 180, no se observa la presencia de estas células (Figura 22).

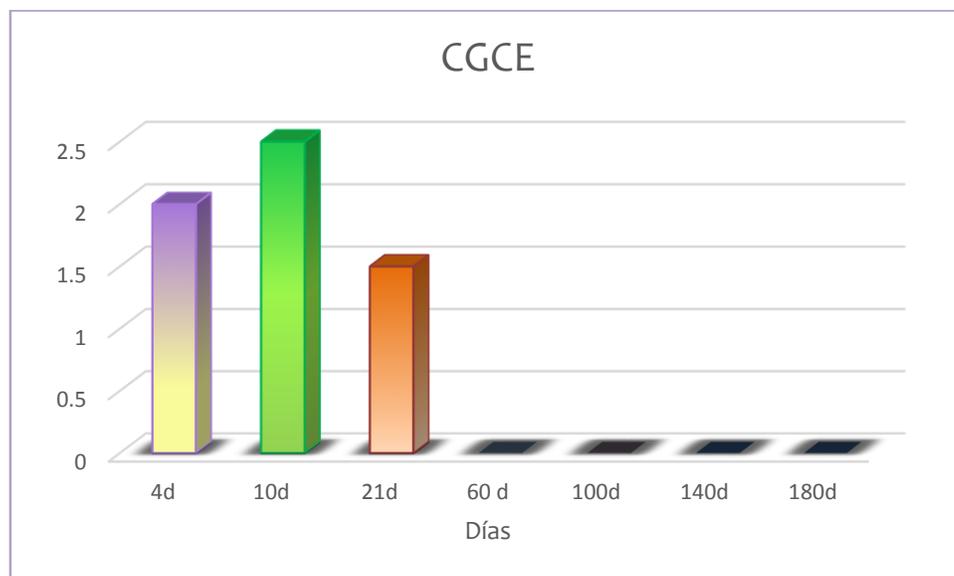


Figura 22 Gráfica del conteo celular gigantes de cuerpo extraño

XI• DISCUSIÓN

La bioingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario que ayuda al desarrollo de sustitutos biológicos, con el objetivo de lograr la regeneración de tejidos de manera anatómica y fisiológica en sitios que han presentado daño.

Existen diferentes materiales, que se han estudiado para tratar la regeneración de tejidos, uno de ellos es el poliácido láctico (PLA), el cual es un biomaterial apropiado para el uso en el cuerpo humano debido a sus propiedades, tal como: biocompatibilidad induciendo la adhesión, proliferación y diferenciación celular.

Las propiedades químicas del PLA permiten la hidrólisis, una vez degradado los componentes monoméricos se eliminan por vías naturales del cuerpo (ciclo del ácido tricarbóxico), por tal motivo son buenos candidatos al emplearlos en defectos en el cuerpo humano, en el caso de la odontología, se podría emplear en lesiones óseas de cabeza y cuello.

Otro aspecto importante son las propiedades mecánicas de los andamios deben de ser lo más parecidos a las propiedades del tejido que se pretenda regenerar ya que no deben de colapsar durante su manipulación, ni durante las actividades normales del paciente, también deben ser fácilmente esterilizables para prevenir infecciones al entrar en contacto con el cuerpo humano⁽⁵¹⁾.

Un factor indispensable para el éxito de un andamio es la degradación, la cual afecta la adhesión y proliferación celular, la síntesis del tejido y la respuesta del hospedero; una característica deseable en un andamio, es la sincronización de la degradación del material del que se coloca en el sitio de interés y la formación de tejido en la misma zona, con la finalidad de que la zona sea regenerada y no solo se forme tejido de reparación. ⁽⁵²⁾

El propósito de este proyecto fue evaluar la degradación de andamios de PLA impresos en 3D tomando a diferentes tiempos (4, 10, 20, 60, 100, 140 y 180 días) tomando en cuenta el peso, espesor y diámetro de las muestras, así como el cambio en el pH de las soluciones, por otro lado se evaluó la estructura superficial de las muestras sometidas a degradación, así como su comportamiento mecánico. Una vez que se concluyó con la parte *in vitro*, se realizaron pruebas de biocompatibilidad en el tejido subcutáneo de ratas *Wistar*.

Con respecto a los resultados, el peso promedio remanente de los andamios de PLA impresos en 3D, respecto al tiempo de exposición al medio de hidrólisis (PBS y agua desionizada, experimental y control respectivamente), el comportamiento fue el esperado, ya que al someterlo a degradación, se pierde la masa del material y por consiguiente el peso, siendo más evidente en el grupo experimental a pesar que

en los primeros tiempos no se modificó el peso, hasta el día 60, siendo más notable a partir de los 100 a los 180 días, en este último, obteniendo la mayor pérdida de peso, infiriendo que la degradación de PBS se está dando de manera lenta (53).

En el caso de la muestras del grupo control (agua bidestilada) no se apreció una pérdida de peso, lo que se puede asociar a que el agua bidestilada degrada de manera más lenta la muestra, ya que ambos grupos (control y experimental) se metieron al mismo y con los mismos parámetros.

Nuestros resultados concuerdan con los de Felfel y col. (2000) donde demuestra que las fibras de poliácido-láctico y policaprolactona (PLA-PCL) no modifican significativamente su peso en el medio salino tamponado con fosfatos (PBS) a 37°C después de 100 días. Nuestros resultados son similares a partir de los 80 días ya que presentaba pérdida de continuidad en las fibras, por lo cual se puede dilucidar que los andamios de PLA impresos en 3D son biodegradables, ya que su peso está disminuyendo respecto al tiempo(45).

Por otro lado, haciendo una comparativa entre los grupos control y experimental, donde se evaluó el diámetro de las muestras, se encontró respecto a los resultados que el diámetro final aumento, por lo que se discierne que su forma convexa se vio modificada a lo largo del tiempo, pasando de una estructura con determinada concavidad y convexidad, a una estructura de forma aplanada. Por consiguiente ambas condiciones (agua bidestilada y PBS) adicionando el factor temperatura, juegan un papel importante en la forma macrométrica del andamio. Comprobando lo anterior con la medida del espesor, ya que solo se modificó la estructura y no el espesor, posiblemente a que la degradación hidrolítica del PLA sucede principalmente en la superficie de una muestra sólida y se propaga hacia su centro. La escisión de las cadenas hidrolíticas precede preferencialmente en las zonas amorfas y esto conduce a un aumento en la cristalinidad del polímero. La modificación de la opacidad de las muestras pueden ser explicadas por estos fenómenos, ya sea por la formación de agujeros en la mayor parte de la muestra durante la degradación o por una evolución en la matriz polimérica. Desde que la degradación hidrolítica toma lugar en las zonas amorfas de la matriz, este fenómeno permite predecir un incremento en la cristalinidad del PLA, lo cual produce la opacidad general de las muestras(54).

En la Figura 10 correspondiente a la evaluación de pH se detalla, que las muestras degradadas en el grupo experimental (PBS) comenzaron con un pH ligeramente ácido, terminando con un pH neutro, por lo que a este fenómeno se le puede atribuir la composición del PBS (Cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio) creando un efecto amortiguador, favoreciendo al andamio para ser un

buen candidato para su utilización en tejidos vivos, ya que no se presentaría un daño tisular ocasionado por la acidez del polímero.

Las soluciones amortiguadoras, conocidas como soluciones buffer o tampón, son disoluciones que están compuestas por el ion común de un ácido débil o de una base débil y el mismo ion común en una sal conjugada, ambos componentes deben estar presentes. Se dice que una solución amortiguadora, reguladora o tampón no se ve afectada significativamente por la adición de pequeñas cantidades o volúmenes de ácido y bases, a pesar que se ha demostrado que existe una pérdida de peso en los andamios experimentales, estos iones estimulan a la formación de un pH cercano a la neutralidad⁽⁵⁵⁾.

El agua destilada inicialmente posee un pH de 6.68, es decir no es totalmente neutra, ya que el agua, ella ha sido previamente sometida a un tratamiento donde se encuentra parcialmente libre de iones, por lo que se esperaría que el ataque hidrolítico al polímero no sea de manera tan apreciable como en el PBS que posee iones adicionales, por lo que si comparamos los valores iniciales de pH con los valores obtenidos en los tiempos finales de la misma, se evidenció un comportamiento similar a partir de los 140 días en donde ambos grupos se mantiene neutros.

En función de los medios de degradación evaluados en este proyecto, se consideró que una característica común en el PLA en el proceso hidrolítico es su blanqueamiento, a medida que avanza dicho proceso las zonas se notaban blancas con microgrietas en el material (fragmentación), porosidad y fragilidad. Es decir en un tiempo de 180 días aunque aparentemente conservó su integridad física, las muestras presentaron un comportamiento mecánico diferente, el módulo elástico de las muestras experimentales aumento de manera significativa, indicando que las muestras a partir de este periodo son muy rígidas y por consiguiente frágiles; en contraste con las muestras control, las cuales siguieron con un comportamiento más elástico. Por lo anterior, los iones de medio juegan un papel importante en la degradación del material, por un lado mantienen un pH compatible con los tejidos y por lo otro ayudan a que el andamio de PLA se degrade más rápido.

Lo anteriormente descrito se corroboró con el análisis de la estructura superficial de los andamios, a los cuales además de evaluar su estructura se cuantificó el tamaño de las fibras. En los primeros días se puede observar ligeras irregularidades, incluso al compararse con la micrografía inicial (antes de someterlas al PBS o agua).

El material experimenta cierto grado de degradación, la cual se propaga por toda la superficie de las nanofibras siendo en el centro de estas donde se observa un mayor cambio por lo que se infiere que estas zonas son las responsables en presentar

mayor fragilidad, lo que concuerda con los resultados en el cambio de diámetro, comprobando que la muestra de ser cóncava, se modifica a plana.

Siguiendo con la estructura superficial, las muestras del grupo experimental muestran zonas de fractura del material, liberando producto de la degradación del material, perdiendo la integridad física y haciéndolo visiblemente más poroso. También se pueden observar presencia de zonas con densidad variables los cuales puede corresponder a cúmulos de sales que conforman el PBS.

En el caso del grupo control a pesar de que se observaron irregularidades en la matriz de PLA, está permaneció más íntegra, no experimentando una mayor degradación.

Es evidente que en los compuestos de PLA del grupo experimental, en relación al grupo control, la velocidad de degradación obtenida es mayor, corroborando dicho dato con los resultados de las pruebas mecánicas.

En cuanto a los resultados *in vivo* se demostró que el material no se degrada completamente después de 180 días, sin embargo es considerado biocompatible debido a que la respuesta inflamatoria disminuyó con el paso del tiempo en la zona del defecto. Nuestros resultados contrastan con los de Gómes en 2004, donde menciona que el PLA se degrada *in vivo* por medio de una reacción hidrolítica siendo sus metabolitos naturales, los que se eliminan del cuerpo a través de la excreción de orina y por vía respiratoria, por lo cual reporto que aunque sus productos de degradación no son tóxicos, son de naturaleza ácida, causando una disminución en el pH local y provoca una respuesta inflamatoria más fuerte. Sin embargo nuestros resultados demuestran que ya no hay presencia de respuesta inflamatoria a partir de los 60 días e incluso el conteo de células gigantes de tipo cuerpo extraño, fue disminuyendo a partir de los 21 días, sin encontrar evidencia de estas a partir de los 60 días. Por lo cual se puede inferir que el tiempo crucial de respuesta es hasta los 60 días. Los resultados se corroboran con la formación de una cápsula fibrosa alrededor del andamio, la cual presenta mayor grosor a los 21 días, dicha cápsula se desintegró a partir de los 100 días, únicamente se observaba tejido conectivo desorganizado, lo que indica que el material se integra sin problema a los tejidos ⁽⁵⁶⁾.

Con base a todos los resultados, los andamios de PLA impresos en 3D, pueden ser considerados biodegradables en tiempos largos y biocompatibles con el tejido celular subcutáneo de ratas Wistar. Como perspectivas al presente proyecto, es importante continuar con experimentación *in vitro* en cultivo celular, así como, en la colocación de los andamios en defectos de tejidos de interés a regenerar, por ejemplo el tejido óseo, lo anterior para corroborar su biocompatibilidad así como su potencial en la regeneración de tejidos^(57,58).

XII• CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos de las pruebas *in vitro* e *in vivo* realizadas durante el periodo comprendido de 0 – 180 días, se puede concluir que:

- ✓ El PBS no muestra modificación, ya que se mantiene en un pH neutro desde el día 0 al día 180. Sin embargo el agua bidestilada muestra un cambio de pH iniciando en ácido y al día 180 manteniéndose en neutralidad
- ✓ El peso de ambos grupos se mantiene hasta el día 60, posterior a ello el grupo experimental se mantiene hasta el día 100 y el grupo control registra un aumento hasta los 180 días.
- ✓ Diámetro muestra una reducción al 180, por lo que podemos inferir que la degradación de las fibras en ambos grupos es favorable.
- ✓ Los andamios de PLA fabricados mediante técnica capa por capa muestran propiedades fisicoquímicas y mecánicas favorables, para ser considerados biocompatibles y biodegradables.
- ✓ El andamio impreso en 3D, es considerado biocompatible ya que la respuesta inflamatoria inicialmente fue leve y fue disminuyendo con el tiempo, al igual que las células gigantes de cuerpo extraño.

XIII• REFERENCIAS

1. Megías M, Molist P, Pombal MA. Tejidos animales, tejidos conectivos óseos. [Internet]. 2017. Available from: <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/a-conectivo-oseo.pdf> [Junio 2018]
2. Manuel FJ. Estudio de biocompatibilidad de polímeros sintéticos y su aplicación en Ingeniería de tejido óseo [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de la Plata Facultad de ciencias exactas departamento de ciencias biologicas; 2011.
3. Fallis A. Sistema esquelético: funciones. Huesos: Estructuras y clasificación. Histología del tejido óseo: Células , tejido óseo compacto y tejido óseo esponjoso. Formación y crecimiento de los huesos. Divisiones del sistema esquelético. Principales huesos de las d. J Chem Inf Model. 2013;53(9):1689–99.
4. Bifani P. Books @ Books.Google.Com.Mx [Internet]. 1999. p. 1–601. [06 de diciembre del 2018] Available from: https://books.google.com.mx/books?id=TQfX0cL3ieQC&pg=PA324&lpg=PA324&dq=Biodiversidad+de+Oaxaca,+México+Perez++Franco+2004&source=bl&ots=6kOQrHsaSI&sig=ItLW7u0QrOOfgU3KKrH6dFQf7RY&hl=es-419&sa=X&ved=0CCQQ6AEwAWoVChMI0_O904O0yAIVS5SICCh21tw3P#v=onepage
5. C MM. Fisiología ósea. Craniofacial Dev growth Evol. 2002;cap. 3.
6. Anónimo. Fisiopatología ósea. Funciones de los huesos.[Internet] [06 de noviembre del 2018]
7. Anónimo. Estudio de la morfología del cuerpo vertebral de una L4 humana con modelos de remodelación ósea interna y externa. Capitulo3 Biología ósea. In 1955. p. 37–72.
8. P. Infante-Cossío1, J.L. Gutiérrez-Pérez1, D. Torres-Lagares2, A. García-Perla García1 JDG-P. Relleno de cavidades óseas en cirugía maxilofacial con materiales autólogos.Rev:Esp Cir Oral y Maxilofacial. 2007;1:7–19.
9. Pages CM. Reconstrucción del maxilar posterior atrófico con células madre mesenquimales. [Tesis de doctorado]: Catalunya Universidad Inyernacional de Catalunya; 2008
10. Fernández, Tresguerres, Hernandez Gil AG. Bases fisiologicas de la regeneracion ósea II. El proceso de remodelado. Med Oral Patol Ci Bucal. 2006;1:1–7.
11. Cruzado AB. Efecto en la regeneracion osea guiada de una membrana de

- PLGA modificada a nivel Micro - topografico con plasma de oxigeno y funcionalizada con una capa inorganica de oxido de silicio.[Tesis Doctoral]. Sevilla. Universidad de Sevilla; 2015.
12. Rebolledo M, Harris J, Higgins E, Molinares L. Cicatrización y regeneración ósea de los maxilares después de una quistectomía : reporte de un caso y revisión de la literatura.Univ Odontol. 2011;30(65):71–8.
 13. Vigón AO. Eficacia de injertos de hueso xenogénicos en bloque para la regeneración ósea horizontal de la cresta ósea alveolar atrófica.[Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid facultad de filosofía; 2011.
 14. Monzón Trujillo D, Martínez Brito I, Rodríguez Sarduy R, Piña Rodríguez JJ, Pérez Mir EA. Injertos óseos en implantología oral. Rev Medica Electron [Internet]. 2014;36(4):449–61.
 15. Sergio Soto Góngora MGTG. Scielo @ Scielo.Sld.Cu. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2005;42.
 16. María Ines CR, Laura CC, Ricardo A-M, Olman M-M, Andrea UF, Carolina CC. Sustitutos e injertos de piel desarrollados por ingeniería de tejidos. Tecnología en Marcha. Edición especial: Ingeniería de tejidos [Internet]. 2015;(506):46–57.
 17. Zamora García Da. Diseño y construcción de una bio impresora 3D [Tesis de maestría] [Internet]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
 18. Denia D, Navarro M. Ingeniería tisular como puntal de la medicina regenerativa en estomatología. Rev Cubana Estomatol. 2014;51(3):288–304.
 19. Fabres VC. Técnicas del futuro: Ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina productiva. Rev Médica Clínica Las Condes [Internet]. 2010;21(3):488–93.
 20. Rosales Ibáñez R, Alvarado Estrada KN, Ojeda Gutiérrez F. Ingeniería Tisular en Odontología. Rev Adm. 2012;VOL. LXIX(4):164–7.
 21. Ochoa S, Aguilar N, Méndez A. Investigación y Ciencia. 2015;
 22. Anónimo. Estudio del comportamiento de andamios 3D de PLA/PEG para ingeniería de tejidos durante su degradación in vitro 1 [Internet] [24 de Abril del 2018]. Available from: [https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/15040/Rapport Stage Labo_Brice CALVARESE.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/15040/Rapport%20Stage%20Labo_Brice%20CALVARESE.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
 23. Colorado AC , Agudelo CA, MEMA. Análisis de biomateriales para uso en ingeniería. Rev Ing Biomédica. 2013;7:11–23.
 24. Stupenengo F. Materiales y materias primas - Materiales compuestos. In:

- Materiales y materias primas [Internet]. 2011. p. 7–11. Available from: <http://www.inet.edu.ar/wp-content/uploads/2012/11/materiales-compuestos.pdf>
25. Gallardo, Alberto VB, National S. “Ingeniería de tejidos”: Contribucion de los polimeros al desarrollo de los procesos de regeneracion tisular. 2014;(January 2000).
 26. Sebastian J, Valencia C, Zuluaga F. Implantología oral y reconstuctiva descripción de los cambios histologicas producidos a 60 días por una matriz de ácido poliláctico de alto peso molecular aglutinada con fosfato tricálcico injertada en calvaria de rata. ResearchGate. 2012;(October).
 27. Xiao L, Wang B, Yang G, Gauthier M. Poly (Lactic Acid) -Based Biomaterials : Synthesis , Modification and Applications. 2012; Biomedical Science Engineering and Techonology.
 28. Lr G-V, -Gutiérrez E, Ja R-V-M, -Méndez-Villamil H, -García S, Banegas-Ruiz R, et al. Impresión de modelos 3D para fracturas de radio distal: un estudio piloto en el Instituto Nacional de Rehabilitación 3D. www.sanidadmilitar.org.mx artículo original Rev Sanid Milit Mex. 2017;71:366–73.
 29. Aranda CG. Bioimpresoras 3D como herramienta de inovacion en el futuro de trasplantes de órganos. RECI [Internet]. 2000;5(10):101–16. Available from: <http://www.reci.org.mx/index.php/reci/article/view/53>
 30. López Conde JE. Nota de futuro2/2016 Impresoras 3D.[Internet] [14 de noviembre del 2018]. Available from: https://intranet.bibliotecasgc.bage.es/intranet-tmpl/prog/local_repository/documents/17854.pdf
 31. Calvo Santo-Rosa A. Análisis y simulación numérica del proceso de biodegradación por hidrólisis de biopolímeros en aplicaciones biomédicas [Internet]. 2013. Available from: <http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/5275>
 32. Ribeiro L, Castro E, Ferreira M, Helena D, Robles R, Faria e Almeida A, et al. Conceptos y aplicaciones de la ingeniería tisular en Otorrinolaringología. Acta Otorrinolaringol Esp. 2015;66(1):43–8.
 33. Anónimo. Pruebas-para-evaluacion-de-biocompatibilidad @ sites.google.com [Internet]. Available from: <https://sites.google.com/site/materialesdentalesuvrmd/home/unidad-2/pruebas-para-evaluacion-de-biocompatibilidad>
 34. Ramot Y, Haim-Zada M, Domb AJ, Nyska A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2016;107:153–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.012>

35. Arrieta MP. Films de PLA y PLA-PHB plastificados para su aplicación en envases de alimentos. Caracterización y análisis de los procesos de degradación. [Tesis doctoral]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia: 2014. Available from: <http://hdl.handle.net/10251/39338>
36. Serna L, Rodríguez A, Albán F. Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y Aplicaciones. Rev: Ingeniería y Competitividad, 2003;5(1):16–26.
37. P. García Barreno. Inflamación. Rev R Acad Cienc Exact Fis Nat. 2008;102(1):91–159.
38. Bórdes R, Martínez M, García E, Guisado R. El proceso inflamatorio. Rev Enfermería [Internet] [07 de enero del 2019], 1994;4:9–12. Available from: http://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero_4/pinflamatorio4.htm
39. Vega Robledo GB. Inflamación. Rev Fac Med UNAM [Internet]. 2008;51(5):220–2.
40. Arredondo. Inflamación y dolor en cirugía oral. [Tesis de licenciatura]. México
41. Manchola J, Moreno S. Reacción granulomatosa de tipo cuerpo extraño secundaria a biomateriales y su respuesta inmunológica. Rev Mexicana de Anestesiología. 2016;2(1):21–8.
42. Enrique-santos D. Fisiopatología de la respuesta inflamatoria durante el perioperatorio. 2007;30.
43. Senet P. Fisiología de la cicatrización cutánea. EMC - Dermatología [Internet]. 2011;42(1):1–10. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1761-2896\(08\)70356-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1761-2896(08)70356-X)
44. Ghobeira R, Philips C, Declercq H, Cools P, De Geyter N, Cornelissen R, et al. Effects of different sterilization methods on the physico-chemical and bioresponsive properties of plasma-treated polycaprolactone films. Biomed Mater. 2017;12(1).
45. Felfel RM, Poocha L, Gimeno-Fabra M, Milde T, Hildebrand G, Ahmed I, et al. In vitro degradation and mechanical properties of PLA-PCL copolymer unit cell scaffolds generated by two-photon polymerization. Biomed Mater. 2016;11(1):015011.
46. NOM-062-Zoo-199. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 1999;1–58.
47. NOM-029-ZOO-1995, Características y especificaciones para las instalaciones y equipo de laboratorios de pruebas y/o análisis en materia zoonosanitaria. 1995;1–15.
48. NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y

- silvestres. J Geotech Geoenvironmental Eng ASCE. 1995;120(11):259.
49. NOM-046-ZOO-1995. 1995; Sistema Nacional de vigilancia epizootiológica;1–10.
 50. NOM-051-ZOO-1995, Trato humanitario en la movilización en animales. J Geotech Geoenvironmental Eng ASCE. 1995;120(11):259.
 51. Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering [Internet]. Vol. 27, Biomaterials. Elsevier; 2006 [cited 2019 Jun 14]. p. 3413–31. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961206001232>
 52. Sung H, Meredith C, Johnson C, Galis ZS. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. ELSEVIER. 2004;25:5735–42.
 53. Makino K., Arakawa M KT. Preparation and in vitro degradation properties of polylactide microcapsules. 3:1195–201.
 54. M.A Paul, C. Delcourt, Monteverde F, Dubois P y cols. Polylactide / montmorillonite nanocomposites: study of the hydrolytic degradation. 2005;87:535–42.
 55. Anónimo. Tampón químico [Internet]. Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Tampón_químico
 56. Gomes ME, Reis RL. Biodegradable polymers and composites in biomedical applications: From catgut to tissue engineering Part 1 Available systems and their properties. Int Mater Rev. 2004;49(5):261–73.
 57. Danoux CB, Barbieri D, Yuah H, Brujin JD , Van CA, Habibovic P. In vitro and in vivo bioactivity assessment of a polylactic acid/hydroxyapatite composite for bone regeneration. Biomatter. 2014;4.
 58. Athanasiou KA, Niederauer GG AC. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers. J Exp Med. 1996;17(5):93–102.

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

Anexos

A• Tabla de resultados. Evaluación de peso *in vitro* de andamios 3D experimental

Día	Fecha	Peso en g				
1	15 - oct - 18	¹ 0.0672	² 0.0665	³ 0.0640	⁴ 0.0568	⁵ 0.0681
20	30 – oct – 18	¹ 0.0687	² 0.0678	³ 0.0643	⁴ 0.0667	⁵ 0.0572
60	11 – dic – 18	¹ 0.0689	² 0.0679	³ 0.0682	⁴ 0.0552	⁵ 0.0592
100	18 – 01 – 19	¹	² 0.0545	³ 0.0547	⁴ 0.0696	⁵ 0.0711
140	01 – 03 – 19	¹	² 0.0589	³ 0.0557	⁴ 0.0722	⁵ 0.0646
180	10 – 04 - 19	¹	² 0.0618	³ 0.0586	⁴ 0.0783	⁵ 0.668

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

B• Tabla de resultados. Evaluación de diámetro *in vitro* de andamios 3D experimental

Día	Fecha	Diámetro mm				
1	15 - oct - 18	¹ 6.22	² 6.71	³ 6.60	⁴ 6.17	⁵ 7.21
20	30 – oct – 18	¹ 6.95	² 6.33	³ 6.84	⁴ 6.49	⁵ 6.35
60	11 – dic – 18	¹ 6.94	² 6.10	³ 6.68	⁴ 6.55	⁵ 6.28
100	18 – 01 – 19	¹	² 8.48	³ 8.69	⁴ 8.62	⁵ 8.45
140	01 – 03 – 19	¹	² 7.57	³ 7.71	⁴ 7.92	⁵ 7.22
180	10 – 04 - 19	¹	² 8.26	³ 8.60	⁴ 8.37	⁵ 8.56

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

C• Tabla de resultados. Evaluación de espesor *in vitro* de andamios 3D experimental

Día	Fecha	Espesor				
1	15 - oct - 18	¹ 1.90	² 1.98	³ 1.74	⁴ 1.81	⁵ 1.72
20	30 - oct - 18	¹ 1.81	² 2.35	³ 1.86	⁴ 2.02	⁵ 1.81
60	11 - dic - 18	¹ 1.69	² 1.67	³ 1.66	⁴ 1.94	⁵ 1.89
100	18 - 01 - 19	¹ 1.66	² 1.66	³ 1.66	⁴ 1.91	⁵ 1.84
140	01 - 03 - 19	¹	² 0.69	³ 0.76	⁴ 1.68	⁵ 1.11
180	10 - 04 - 19	¹	² 1.73	³ 1.72	⁴ 1.73	⁵ 2.06

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

D• Tabla de resultados. Evaluación de PH *in vitro* de andamios 3D experimental

Día	Fecha	pH				
1	15 - oct - 18	¹ 7.35	² 7.35	³ 7.34	⁴ 7.35	⁵ 7.35
20	30 – oct – 18	¹ 7.37	² 7.36	³ 7.37	⁴ 7.40	⁵ 7.35
60	11 – dic – 18	¹ 7.44	² 7.43	³ 7.40	⁴ 7.43	⁵ 7.39
100	18 – 01 – 19	¹ 7.44	² 7.40	³ 7.42	⁴ 7.42	⁵ 7.40
140	01 – 03 – 19	¹	² 7.61	³ 7.50	⁴ 7.51	⁵ 7.48
180	10 – 04 - 19	¹	² 7.59	³ 7.57	⁴ 7.53	⁵ 7.49

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

E• Tabla de resultados. Evaluación de peso *in vivo* de andamios 3D control

Día	Fecha	Peso mm				
1	15 - oct - 18	¹ 0.0743	² 0.0606	³ 0.0512	⁴ 0.0575	⁵ 0.0670
20	30 – oct – 18	¹ 0.0747	² 0.0614	³ 0.0520	⁴ 0.0582	⁵ 0.0674
60	11 – dic – 18	¹ 0.0747	² 0.612	³ 0.0519	⁴ 0.0581	⁵ 0.0674
100	18 – 01 – 19	¹ 0.0805	² 0.0712	³ 0.0685	⁴ 0.0639	⁵ 0.0771
140	01 – 03 – 19	¹ 0.0756	² 0.0633	³ 0.0706	⁴ 0.0650	⁵ 0.0708
180	10 – 04 - 19	¹ 0.0812	² 0.0718	³ 0.0769	⁴ 0.0714	⁵ 0.0750

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

F• Tabla de resultados. Evaluación de diámetro *in vivo* de andamios 3D control

Día	Fecha	Diámetro mm				
		1	2	3	4	5
1	15 - oct - 18					
20	30 - oct - 18	¹ 6.59	² 6.41	³ 6.52	⁴ 5.90	⁵ 6.36
60	11 - dic - 18	¹ 6.54	² 6.36	³ 6.31	⁴ 6.34	⁵ 6.04
100	18 - 01 - 19	¹ 8.79	² 8.70	³ 8.56	⁴ 8.54	⁵ 8.44
140	01 - 03 - 19	¹ 8.78	² 8.66	³ 8.58	⁴ 8.62	⁵ 8.64
180	10 - 04 - 19	¹ 6.73	² 6.53	³ 6.26	⁴ 6.04	⁵ 6.35

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

G• Tabla de resultados. Evaluación de espesor *in vivo* de andamios 3D control

Día	Fecha	Espesor				
1	15 - oct - 18	1	2	3	4	5
20	30 – oct – 18	¹ 1.56	² 1.75	³ 1.83	⁴ 1.87	⁵ 1.82
60	11 – dic – 18	¹ 1.63	² 1.92	³ 1.56	⁴ 1.67	⁵ 1.90
100	18 – 01 – 19	¹ 1.66	² 1.59	³ 1.90	⁴ 1.99	⁵ 2.00
140	01 – 03 – 19	¹ 1.84	² 1.75	³ 2.00	⁴ 1.51	⁵ 1.82
180	10 – 04 - 19	¹ 2.27	² 1.78	³ 1.97	⁴ 1.53	⁵ 1.72

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

H• Tabla de resultados. Evaluación de PH *in vivo* de andamios 3D control

Día	Fecha	pH				
1	15 - oct - 18	¹ 6.55	² 6.66	³ 7.34	⁴ 6.18	⁵ 6.69
20	30 - oct - 18	¹ 6.81	² 7.85	³ 7.36	⁴ 6.98	⁵ 7.43
60	11 - dic - 18	¹ 7.47	² 7.93	³ 7.68	⁴ 7.65	⁵ 7.98
100	18 - 01 - 19	¹ 7.67	² 7.79	³ 7.89	⁴ 7.74	⁵ 7.99
140	01 - 03 - 19	¹ 7.56	² 7.67	³ 7.71	⁴ 7.44	⁵ 7.61
180	10 - 04 - 19	¹ 7.63	² 7.56	³ 7.59	⁴ 7.40	⁵ 7.48

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

I• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 20 días de la evaluación *in vitro* grupo experimental

Fecha: 30 de octubre del 2018

Muestra	E1 mm	E2 mm	E3 mm	Distancia inicial probeta	Anchura (mm)	Espesor final (mm)	Espesor posterior a la prueba
1	0.62	0.79	0.25	0.55		5.70	1.17
2	0.39	0.32	0.29	0.33	6.98	4.27	1.27
3	0.25	0.67	0.72	0.54	6.72	4.45	1.09
4	0.34	0.87	0.45	0.55	6.77	4.77	1.23
5	0.84	1.06	0.99	0.96	6.74	5.72	1.25
6	0.08	1.42	1.32	0.94	6.68	5.41	1.41

E1= espesor 1

Distancia inicial probeta = Promedio del espesor

E2= espesor 2

E3= espesor 3

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

J• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 60 días de la evaluación *in vitro* grupo experimental

Fecha: 11 de diciembre del 2018

Muestra	E1 mm	E2 mm	E3 mm	Distancia inicial probeta	Anchura (mm)	Espesor final (mm)	Espesor posterior a la prueba
1	1.68	1.94	1.99	1.87	5.33	7.98	9.28
2	2.11	2.19	1.94	2.08	6.66	7.99	9.39
3	1.99	2.15	2.26	2.13	5.97	7.93	9.47
4	2.38	2.11	2.13	2.20	6.41	8.20	9.24
5	2	2.06	2.28	2.11	5.91	8.44	9.46
6	2.10	2.16	2.21	2.15	5.88	8.30	9.45
7	2.06	2.14	2.07	2.09	7.25	8.46	9.31
8	1.98	2.41	2.46	2.28	6.98	8.28	9.41
9	2.14	2.99	2.28	2.47	6.42	8.34	9.28
10	1.81	2.13	2.03	1.99	6.68	8.08	9.08

E1= espesor 1

Distancia inicial probeta = Promedio del espesor

E2= espesor 2

E3= espesor 3

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

K• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 100 días de la evaluación *in vitro* grupo experimental

Fecha: 18 de enero del 2019

Muestra	E1 mm	E2 mm	E3 mm	Distancia inicial probeta	Anchura (mm)	Espesor final (mm)	Espesor posterior a la prueba
1	1.61	1.83	1.87	1.77	8.87	6.31	1.20
2	1.57	1.61	1.80	1.66	8.67	6.82	1.24
3	1.48	1.72	1.90	1.7	8.65	5.76	1.10
4	1.95	1.83	1.95	1.91	8.72	6.76	1.24
5	1.85	1.78	1.83	1.82	8.81	6.74	1.21
6	1.72	1.83	1.76	1.77	8.59	6.65	1.13
7	1.54	1.63	1.76	1.64	8.59	6.65	0.95
8	1.84	1.62	1.70	1.72	8.53	6.31	1.02
9	1.57	2.30	1.94	1.93	8.71	6.91	1.35
10	1.97	1.95	1.97	1.96	8.62	6.98	1.28

E1= espesor 1

Distancia inicial probeta = Promedio del espesor

E2= espesor 2

E3= espesor

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

L• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 140 días de la evaluación *in vitro* grupo experimental

Fecha: 01 de marzo del 2019

Muestra	E1 mm	E2 mm	E3 mm	Distancia inicial probeta	Anchura (mm)	Espesor final (mm)	Espesor posterior a la prueba
1	2.12	2.10	2.04	4.9	8.84	2.04	1.23
2	1.95	2.04	2.32	4.76	8.51	1.84	1.20
3	1.93	2.05	2.18	4.70	8.54	1.98	1.28
4	2.14	1.70	1.81	4.44	8.65	1.96	1.32
5	2.24	1.79	1.81	4.63	8.27	2.48	1.26
6	2.13	2.03	1.89	4.79	8.59	2.11	1.25
7	1.91	1.89	1.90	4.43	8.48	2.16	1.25
8	2.03	1.98	2.01	4.68	8.53	1.66	0.97
9	2.20	2.01	1.95	4.86	8.55	1.83	1.21
10	2.19	2.03	1.92	4.87	8.63	1.95	0.94

E1= espesor 1

Distancia inicial probeta = Promedio del espesor

E2= espesor 2

E3= espesor

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

M• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 180 días de la evaluación *in vitro* grupo experimental

Fecha: 10 de abril del 2019

Muestra	E1 mm	E2 mm	E3 mm	Distancia inicial probeta	Anchura (mm)	Espesor final (mm)	Espesor posterior a la prueba
1	1.58	2.42	2.01	4.67	8.45	1.92	1.22
2	1.69	1.58	2.04	3.95	8.33	1.90	0.80
3	1.90	2.01	1.80	4.51	8.11	1.80	0.85
4	1.95	1.86	1.85	4.42	8.37	1.7	Rota
5	1.87	1.78	1.89	4.28	8.25	1.85	0.75
6	1.98	2.24	2.11	4.92	8.57	1.92	1.10
7	1.70	2.03	1.40	4.19	8.46	1.68	0.99
8	1.94	2	2.05	4.62	8.35	1.96	0.89
9	1.86	2.10	2.09	4.65	8.20	1.93	0.84
10	2	2.07	1.97	4.72	8.55	2.08	1.09

E1= espesor 1

Distancia inicial probeta = Promedio del espesor

E2= espesor 2

E3= espesor

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

N• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 20 días de la evaluación *in vivo* grupo control

Fecha: 30 de octubre del 2018

Muestra	E1 mm	E2 mm	E3 mm	Distancia inicial probeta	Anchura (mm)	Espesor final (mm)	Espesor posterior a la prueba
1	0.80	1	0.68	0.82	4.60	5.42	1.1
2	0.45	0.27	0.18	0.3	7.40	5.11	1.68
3	1.22	1.04	1.07	1.11	7.69	5.38	1.23
4	0.86	0.91	0.91	0.89	6.84	4.94	1.19
5	0.57	0.85	0.42	0.61	6.96	5.50	1.20
6	0.70	1.18	0.87	0.91	7.66	5.18	1.25

E1= espesor 1

Distancia inicial probeta = Promedio del espesor

E2= espesor 2

E3= espesor

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D in vitro, y evaluación de la respuesta tisular en ratas Wistar, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

O• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 60 días de la evaluación *in vivo* grupo control

Fecha: 11 de diciembre del 2018

Muestra	E1 mm	E2 mm	E3 mm	Distancia inicial probeta	Anchura (mm)	Espesor final (mm)	Espesor posterior a la prueba
1	1.87	1.95	2.22	2.01	5.87	7.49	9.34
2	2.29	2.27	2.30	2.28	6.53	8.43	9.33
3	2	2.20	2.15	2.12	7.06	8.10	8.94
4	2.30	2.50	1.66	2.15	6.56	8.22	9.26
5	2.06	2.20	2.26	2.17	5.82	8.67	8.94
6	2.26	2.40	2.65	2.43	4.96	8.15	9.45
7	2.40	2.43	2.50	2.44	5.97	8.27	9.37
8	1.95	2.20	2.02	2.06	5.77	7.56	9.18
9	1.90	1.81	1.81	1.84	6.49	8.26	9.35
10	2.25	2.23	2.12	2.2	6.68	8.35	9.46

E1= espesor 1

Distancia inicial probeta = Promedio del espesor

E2= espesor 2

E3= espesor

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

P• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 100 días de la evaluación *in vivo* grupo control

Fecha: 18 de enero del 2019

Muestra	E1 mm	E2 mm	E3 mm	Distancia inicial probeta	Anchura (mm)	Espesor final (mm)	Espesor posterior a la prueba
1	1.55	1.71	1.74	1.66	8.44	6.32	1.15
2	1.64	1.73	1.83	1.75	9.03	6.96	1.40
3	1.62	1.38	1.82	1.60	8.44	6.04	1.08
4	1.61	1.86	1.78	1.75	8.80	6.63	1.27
5	1.34	1.97	1.86	1.72	8.72	6.23	1.20
6	1.88	1.77	1.68	1.77	8.65	5.87	1.14
7	1.82	1.69	1.82	1.77	8.60	6.58	1.26
8	1.97	1.80	1.97	1.91	8.61	7.01	1.14
9	1.77	1.83	1.89	1.83	8.78	6.08	1.29
10	1.55	1.88	1.93	1.78	8.59	5.13	0.94

E1= espesor 1

Distancia inicial probeta = Promedio del espesor

E2= espesor 2

E3= espesor

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

Q• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 140 días de la evaluación *in vivo* grupo control

Fecha: 01 de marzo del 2019

Muestra	E1 mm	E2 mm	E3 mm	Distancia inicial probeta	Anchura (mm)	Espesor final (mm)	Espesor posterior a la prueba
1	1.69	1.78	1.58	3.99	8.68	1.52	0.96
2	1.89	2	1.86	4.51	7.91	1.71	1.15
3	2.19	1.93	2.13	4.83	8.07	1.91	0.99
4	2.07	2.13	2.03	5.21	8.50	1.79	0.94
5	1.70	2	1.82	4.30	8.35	1.80	0.95
6	1.93	1.84	1.87	4.39	8.84	2	1.30
7	2.18	2	2.30	4.94	8.47	2.04	1.27
8	1.91	1.69	1.79	4.19	8.62	1.84	1.08
9	2.11	2.30	2.37	5.3	8.43	2.32	1.24
10	1.70	1.71	1.24	3.82	8.07	1.95	0.90

E1= espesor 1

Distancia inicial probeta = Promedio del espesor

E2= espesor 2

E3= espesor

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

R• Tabla de resultados. Pruebas mecánicas de 180 días de la evaluación *in vivo* grupo control

Fecha: 10 de abril del 2019

Muestra	E1 mm	E2 mm	E3 mm	Distancia inicial probeta	Anchura (mm)	Espesor final (mm)	Espesor posterior a la prueba
1	0.40	0.70	0.49	1.23	8.35	1.90	1.21
2	1.76	1.94	1.91	4.33	8.94	2.03	1.14
3	1.67	2.02	1.95	4.34	8.25	2	1.06
4	1.90	1.90	1.69	4.36	8.45	1.94	1.07
5	2.06	2.18	2.04	4.92	8.54	1.96	1.04
6	2.18	1.78	1.85	4.57	8.59	1.83	0.98
7	1.73	1.87	1.75	4.18	8.42	1.80	1.05
8	1.61	1.57	1.64	3.72	8.09	1.82	0.82
9	1.85	2.02	1.79	4.46	7.53	1.80	0.87
10	2.21	1.75	2.18	4.68	7.75	1.54	0.86

E1= espesor 1

Distancia inicial probeta = Promedio del espesor

E2= espesor 2

E3= espesor

Evaluación de la degradación de andamios de PLA impresos en 3D *in vitro*, y evaluación de la respuesta tisular en ratas *Wistar*, para su posible uso en regeneraciones de tejidos.

S• Tabla de pruebas histológicas

Día	Muestra	Inf. Inflamación			Células gigantes				Promedio	Cápsula	
		Leve	Moderado	Severo	C1	C2	C3	C4		Mínimo um	Máximo um
4	1	X			1	3				24.98	102.07
	2	X						1		10.20	48.63
	3	X				1				35.04	30.82
	4	X				1		1		19.10	34.25
	5	X								23.01	84.17
10	1	X			1					91.76	171.14
	2	X			1	1				82.90	107.50
	3	X			1					60.27	133.02
	4	X			2	1				43.98	51.04
	5	X			1		1	1		44.53	55.38
21	1	X			1	1				114.02	314.92
	2	X			1					53.21	164.52
	3	X				1		2		102.07	149.31
	4									98.81	174.83
	5										
60	1									43.44	157.42
	2										
	3										
	4										
	5										