



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**EVALUACIÓN DE LA REGENERACIÓN ÓSEA EN DEFECTOS DE TAMAÑO CRÍTICO EN
CALVIARIAS DE RATAS *WISTAR* POR MEDIO DE ANDAMIOS 3D CON POROSIDAD
GRADUADA.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. LUCÍA PÉREZ SÁNCHEZ

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. JANETH SERRANO BELLO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN. FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA.UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN. FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA.UNAM

DR. DAVID MASUOKA ITO
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos.

A Dios.

Por permitirme terminar esta etapa, con vida, con salud, tanto mía, como de mis seres amados. Por darme fortaleza en los momentos difíciles. Gracias.

A mis padres.

Por estar conmigo en cada momento importante de mi vida, por su amor y apoyo incondicional, sin ustedes esto no hubiera podido ser posible, este logro también es de ustedes, los amo mucho.

A mis abuelitos.

En la compañía de Dios, se que me cuidan y desean lo mejor, les dedicó mi trabajo con mucho amor.

A la Dra. Janeth Serrano Bello.

Por su apoyo incondicional, su conocimiento compartido, sus enseñanzas de vida, por el soporte emocional, por su cariño y comprensión. No tengo palabras para agradecerle todo lo que aprendí de usted, en este tiempo que trabajamos juntas, es un gran ser humano, fue un verdadero honor ser su alumna. Este trabajo es también suyo, sin usted no hubiera sido posible. Mi admiración, respeto y cariño siempre.

A los doctores del laboratorio y amigos

En especial al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez y Dra. Silvia Maldonado Frías, por siempre estar dispuestos apoyarnos a todos los alumnos y por el conocimiento compartido.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio, en especial a Adrián, Diana, Iñigo, Febe, y Osmar, por el apoyo, las risas y aventuras compartidas los quiero mucho. Para los amigos que se adelantaron Laurita y Manuel, siempre en mi corazón.

A mis amigas-alumnas Mary, Ely y Xca gracias por mejorar cada uno de los trabajos que hicimos juntas, con su inteligencia, cariño y sentido del humor. Las quiero mucho.

A mis amigos Tania, José, Mariana, Diana y Estrella por siempre tener un abrazo y palabras de apoyo cuando más lo necesite, ustedes mejoran mi vida. A todos los que formaron parte de esta etapa de mi vida y no mencione, les agradezco y los llevo en el corazón.

Índice

Resumen	3
Abstract	4
Introducción	4
1.-Antecedentes	9
1.1 Hueso	9
1.2 Ingeniería de tejidos óseos y andamios.....	12
1.3 Técnicas de impresión 3D.....	15
1.3.1 Estereolitografía (SLA)	16
1.3.2 Modelado por Deposición Fundida (FDM)	17
1.3.3 Sinterización selectiva por láser (SLS)	18
1.4 Polímeros usados en la impresión 3D.....	20
1.4.1 Características del ácido poliláctico (PLA)	21
1.4.2 Síntesis del PLA	21
1.4.3 Propiedades del PLA	23
1.5 Mecanismo de degradación de polímeros.....	25
1.6 Degradación hidrolítica del PLA.....	26
1.7 Células troncales mesenquimales.....	27
1.7.1 Células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental (DPSC)	30
1.7.2 DPSC y regeneración ósea.....	33
2. Diseño experimental.....	35
Pregunta de Investigación	35
Planteamiento del problema y justificación	35
Hipótesis.....	36
Objetivo General	36
Objetivos Específicos	36
3. Metodología.....	38
4. Resultados	46
4.1 Resultados <i>in vitro</i>	56
4.2 Resultados celular <i>in vitro</i>	64
4.3 Resultados del modelo óseo <i>in vivo</i>	71

5. Discusión	80
5. Conclusiones.....	88
6.- Referencias bibliográficas	89

Resumen

La medicina regenerativa, es un campo que abarca diferentes disciplinas incluidas las biológicas, de la salud e ingenierías, con el objetivo de mantener, reparar o regenerar tejidos u órganos dañados por diferentes factores etiológicos. La ingeniería de tejidos (IT) se refiere a la combinación de células, biomoléculas y andamios, estos últimos sirven como matriz para la colonización de las células troncales, tales como, las derivadas de la pulpa dental (DPSC), las cuales se han utilizado para entender su diferenciación a linaje óseo. Por lo tanto, la hipótesis en este proyecto postula que, el diseño de andamios impresos en 3D con una superficie con porosidad graduada (diferentes tamaños de poros), con tres tipos de poros y degradación *in vitro*, modulá la respuesta de adhesión y proliferación de células DPSC inducidas a linaje óseo, para la regeneración en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas *Wistar*. Para comprobar dicha hipótesis se diseñaron andamios con las características mencionadas y se imprimieron con ácido poliláctico (PLA), los cuales fueron sometidos a degradación *in vitro*, a un tiempo determinado (0, 60, 100, 140 y 180 días), posteriormente se comprobó cuál andamio presentó una mejor respuesta celular, por medio de ensayos de viabilidad (WST-1) y diferenciación (Alizarina Roja y Fosfatasa Alcalina). Los andamios degradados con mejor respuesta (60 días), fueron implantados en defectos de tamaño crítico en calvarias de rata *Wistar* de la siguiente manera; grupos experimentales: 1) andamios impresos en 3D con células DPSC inducidas a linaje óseo, 2) andamios impresos con degradación y DPSC inducidas a linaje óseo y 3) andamios impresos con degradación sin células. Como control (andamios con porosidad graduada y tres tipos de poros). Se evaluó la formación de tejido *novo* mineralizado, a través del imágenes microtomográficas, donde el grupo experimental 3 y control, tuvieron mayor densidad mineral ósea (DMO), lo que permite concluir que dichos andamios son osteoconductores y permiten la formación de tejido mineralizado.

Abstract

Regenerative medicine is a field that encompasses different disciplines including biological, health and engineering, with the aim of maintaining, repairing or regenerating tissues or organs damaged by different etiological factors. Tissue engineering (TE) refers to the combination of cells, biomolecules and scaffolds, the latter serving as a matrix for the colonization of stem cells, such as dental pulp-derived stem cells (DPSC), which have been used to understand their differentiation into bone lineage. Therefore, the hypothesis in this project postulates that the design of 3D printed scaffolds with a graded porosity surface (different pore sizes), with three types of pores and *in vitro* degradation, will modulate the adhesion response and proliferation of induced DPSC cells to bone lineage for regeneration in critical size defects in *Wistar* rat calvariae. To test this hypothesis, scaffolds with the mentioned characteristics were designed and printed with polylactic acid (PLA), which were subjected to *in vitro* degradation, at a determined time (0, 60, 100, 140 and 180 days), subsequently it was verified which scaffold presented a better cellular response, by means of viability (WST-1) and differentiation (Alizarin Red and Alkaline Phosphatase) assays. The degraded scaffolds with the best response (60 days) were implanted in critical size defects in *Wistar* rat calvariae as follows; experimental groups: 1) 3D printed scaffolds with DPSC cells induced to bone lineage, 2) printed scaffolds with degradation and DPSC induced to bone lineage and 3) printed scaffolds with degradation without cells. As control (scaffolds with graded porosity and three types of pores). The formation of new mineralized tissue was evaluated through microtomographic images, where the experimental group 3 and control had higher bone mineral density (BMD), which allows concluding that these scaffolds are osteoconductive and allow the formation of mineralized tissue.

Introducción

La medicina regenerativa, es un campo que abarca varias disciplinas incluidas la biología de las células troncales, tecnología de manipulación celular, terapia génica e ingeniería de tejidos y biomateriales, por mencionar algunas. Teniendo como principal objetivo, el potencial de reemplazar o regenerar tejidos u órganos dañados, por la edad, enfermedad o trauma(1). Por otro lado, la ingeniería de tejidos (IT) se refiere a la práctica de combinar diferentes metodologías como es la incorporación de líneas celulares, andamios y biomoléculas (2).

El hueso es el segundo tejido más trasplantado después del tejido hematopoyético (3). Está formado por tejido conectivo mineralizado, heterogéneo, jerárquico, con una matriz extracelular que contiene una parte orgánica y otra inorgánica (o mineral). La matriz extracelular está en constante cambio y es en donde se llevan a cabo diferentes procesos bioquímicos y celulares. La principal función de este tejido es conformar el sistema esquelético que protege y sostiene a los órganos del cuerpo humano, así como permitir la movilidad de este último. Además de almacenar calcio, fosfato y otros minerales, y contener la médula ósea (3).

Los principales tratamientos para la regeneración ósea en el área clínica se basan en el uso de injertos (autoinjertos, aloinjertos y aloplásticos). Siendo el “estándar de oro” los autoinjertos ya que promueven la osteogénesis; sin embargo, este tipo de injerto tiene varias desventajas que limitan su uso, como son: la cantidad de tejido donante y el inevitable trauma quirúrgico adicional al paciente, con un alto riesgo de morbilidad en el sitio donante. Por otro lado, los aloinjertos son una alternativa que se encuentran en mayor cantidad en comparación con los autoinjertos, pero en ellos existe riesgo de transmisión de enfermedades y rechazo inmunológico. Los aloplásticos promueven la osteoconducción, no obstante, muestran propiedades mecánicas incompatibles al hueso (4,5), además no se adaptan a la forma y tamaño del defecto, siendo un reto significativo en regiones anatómicas de gran tamaño.

Por lo anteriormente descrito, la IT ha desarrollado como principal estrategia para la regeneración ósea el uso de andamios, que son estructuras tridimensionales artificiales que funcionan como marco para la migración, proliferación y diferenciación celular, imitando la

función de la matriz extracelular (MEC) a nivel estructural, al mismo tiempo que soportan las cargas mecánicas aplicadas mientras se produce la regeneración.

Los andamios deben cumplir con las siguientes características: biocompatibles, biorreabsorbibles y biodegradables, con el fin de evitar reacciones adversas en el cuerpo y ser reemplazados gradualmente por tejido sano. Los productos de degradación de los andamios deben ser no tóxicos y no inmunogénico, para ser procesado y desechados por el cuerpo humano, los andamios pueden ser bioactivos, promoviendo la diferenciación celular, la regeneración y producción de matriz extracelular (MEC) (5,6). Además, se busca que las características estructurales incluyan un diseño biomimético, y que en un futuro se pueda personalizar para cada paciente.

Existen diferentes métodos de fabricación de andamios, entre ellos están: lixiviación de partículas, la formación de espuma con gas, la separación de fases y electrohilado. Sin embargo, su principal desventaja de esta técnica se debe a sus propiedades de manufacturación no predecibles, provocando un limitado control en las características de los andamios como: el tamaño de poro, la porosidad y la geometría del andamio (6,7). Para superar estos desafíos, las técnicas de impresión 3D, han surgido como un enfoque ideal que permite controlar tales propiedades y puede personalizar andamios con geometrías precisas a los defectos óseos, a través de imágenes médicas, específicamente la técnica de modelado por deposición fundida (FDM). Esta técnica consiste en depositar el material termoplástico en estado líquido, extruyendo el material a través de un cabezal y depositando el material en capas delgadas en una superficie plana, construyendo de esta forma el modelo tridimensional capa por capa(8).

La técnica de impresión 3D FDM permite el uso de diferentes polímeros termoplásticos como: policaprolactona (PCL) y ácido poliláctico (PLA) (7). El PLA está aprobado por la FDA debido a sus características de biocompatibilidad, biodegradación y propiedades mecánicas (Modulo de Young y esfuerzo máximo) adecuadas para su uso en ingeniería de tejidos. Los productos de degradación del PLA han demostrado poseer una alta biocompatibilidad y baja citotoxicidad en el tejido local donde se implanta. La gran procesabilidad térmica, excelente fuerza de tracción, módulo de Young alto permiten que el polímero de PLA sea utilizado como filamento de impresión para generar andamios 3D diseñados con construcciones complejas.

Aunque el uso de la técnica de impresión 3D basada en modelado por deposición fundida es potencial en particular en la ingeniería de tejidos óseos, todavía quedan algunos inconvenientes relacionados con los enfoques actuales, como es la resolución de la impresión, que es aproximadamente de más de 100 μm debido a la resistencia a la alta presión en la boquilla de impresión. Por lo tanto, el tamaño de poro y la porosidad de los andamios es un reto para la impresión 3D FDM en la investigación. El tamaño de poro funciona para favorecer la adhesión, proliferación celular, además de influir diferenciación celular. El rango de tamaño de poro que ha sido reportado para la adhesión celular es 100 μm - 400 μm , mientras que los poros considerados favorables para la vascularización se encuentran dentro de los rangos 500 μm -1000 μm (8–10). Por lo tanto, se sugiere crear andamios con porosidad graduada, es decir, andamios con tamaños de poros distintos, para no limitar el funcionamiento del andamio.

Bracaglia et al. (9) mencionan que el tejido nativo óseo es naturalmente poroso, además no se distribuye de manera homogénea. El tejido óseo tiene tamaños de poros distintos que varían en función de las señales topológicas, lo que permite que las células sinteticen matriz extracelular mineralizada, que facilitan el crecimiento óseo. Por lo tanto, un andamio que solo posee un tamaño de poro en uno tendrá limitaciones funcionales. Otro parámetro importante es la porosidad que es el porcentaje de espacios vacíos de un sólido, siendo una medida indispensable de la permeabilidad de nutrientes y que permite el intercambio de oxígeno, el aumento de la porosidad afecta directamente las propiedades mecánicas y la degradación del material(10). *Chung et al.* (11) mencionan que los andamios pueden tener tres tipos de poros; poro cerrado que están aislados dentro de la estructura y favorecen la adhesión celular, poro abierto que conectan la estructura interna con la externa, permite el flujo de líquidos o gases y poro ciego que es similar al poro cerrado, pero de mayor diámetro y puede conectarse con una superficie interna o externa, todos ellos juegan un papel importante en la ingeniería de tejidos.

Por otra parte, la degradación del PLA se lleva a cabo aproximadamente de 12-24 meses y algunos estudios *in vivo* han demostrado que el PLA altamente cristalino llega a degradarse completamente en 2 a 5 años. Por lo tanto, el tiempo de degradación puede ser una limitante para la regeneración ósea en donde la mineralización del tejido *novus* se puede evaluar desde el primer mes. En este proyecto se propuso llevar a cabo un procedimiento de degradación *in vitro* del material, por medio de solución de Lactato de Ringer Hartmann que imita en contenido a las soluciones fisiológicas propias del cuerpo(12).

Por otro lado, el uso de células troncales mesenquimales en la medicina regenerativa sigue siendo fundamental, debido a sus características de autorrenovación, diferenciación e inmunomodulación ampliamente descritas en la literatura (14). Las células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea (BMSC) se utiliza con mayor frecuencia para la regeneración ósea; sin embargo, existen otras fuentes para aislar células troncales mesenquimales somáticas para este fin, por ejemplo: tejido adiposo, dermis, tejido sinovial, dentales y periodontales (13). Las células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental (DPSC) fueron las primeras células caracterizadas y aisladas de la cavidad oral por *Gronthos et al.* (14), su uso en la regeneración ósea ha adquirido un papel importante, ya que existen diversos estudios que han demostrado que las DPSC pueden producir un alto volumen de matriz mineralizada, en comparación con las células BMSC, ya que el sitio donante es más accesible y con menos riesgos adyacentes y este tipo de células presentan una alta proliferación celular y se inducen fácilmente al linaje óseo cultivándolas en un medio de cultivo osteogénico. Por otro lado, análisis de microarreglos de DNA demuestran que las DPSC comparten un perfil de expresión génica similar a las BMSC(15,16).

Por lo tanto, de acuerdo con lo descrito con anterioridad, en este proyecto de investigación se imprimieron andamios 3D por medio de la técnica FDM, los cuales se ajustaron de manera exacta al defecto óseo tanto en forma como en tamaño, la superficie se imprimió con porosidad graduada incluyendo tres tipos de poros diferentes. Además se llevó a cabo un proceso de degradación *in vitro* y se sembraron células DPSC en los andamios 3D, previamente diferenciadas en linaje óseo. Posteriormente fueron implantados en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas de estirpe *Wistar*, categorizados en tres grupos experimentales (1. Andamio con células DPSC inducidas a linaje óseo, 2. Andamio impreso con proceso de degradación *in vitro* y DPSC inducidas a linaje óseo y 3. Andamio impreso con proceso de degradación *in vitro* sin células) y un grupo control (andamio con porosidad graduada y tres tipos de poros). Una vez, implantados los andamios de acuerdo con las categorías anteriormente mencionadas, se evaluó la formación de tejido *novo* mineralizado, utilizando imágenes microtomográficas, cuyos resultados fueron prometedores en la regeneración ósea, aminorando las limitaciones que han presentado las estrategias actuales en la ingeniería de tejidos.

1.-Antecedentes

1.1 Hueso

De manera inicial, es importante describir las características principales del hueso, el cual es un tejido conectivo mineralizado, heterogéneo, jerárquico, que presenta diferentes funciones como son las mecánicas (protección, forma, movimiento y locomoción), sintéticas (síntesis de células sanguíneas) y funciones metabólicas (almacenamiento de minerales, regulación de calcio y fósforo, almacenamiento de grasa) (17) Además, el hueso está compuesto por una matriz orgánica e inorgánica (mineral), el principal componente de la fase orgánica se encuentran las fibras de colágeno tipo I; sin embargo, también está compuesta por proteínas no colágenas, lípidos, moléculas de proteoglicano, osteopontina, osteocalcina, osteonectina, fibronectina, sialoproteína II, proteína morfogenética ósea y proteínas séricas, las cuales tienen un papel fundamental en dar resistencia al tejido y características adhesivas.(18) Por otro lado, la fase inorgánica se compone principalmente de cristales de hidroxiapatita (HA), cuya fórmula química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, la presencia de Ca^{2+} y $(\text{PO}_4)^{3-}$ promueve la unión a la superficie y las interacciones electrostáticas, estos cristales se organizan en paralelo a los ejes de las fibras de colágeno, mediante el autoensamblaje de las triples hélices de colágeno (17) Además de la fase orgánica e inorgánica de la matriz ósea, las células son fundamentales para el funcionamiento del tejido óseo (véase figura 1A)(19). Las principales células involucradas en esta función se encuentran: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Las células osteoprogenitoras son células troncales mesenquimales pluripotentes, tienen la función de diferenciarse a células osteoblásticas formadoras de la matriz mineral ósea y también como células de reservorio, los osteoblastos secretan colágeno tipo 1, proteínas no colágenas (OCN, OPN, osteonectina) y proteoglicanos para formar una matriz orgánica. Esta matriz se mineraliza a través de dos procesos complejos conocidos como fases vesicular y fibrilar. Los osteoblastos maduros, pueden sufrir apoptosis o convertirse en osteocitos o células de revestimiento óseo, en el caso de que se convierten en osteocitos, tienen la función como mecanosensores a través del sistema lacunocanalicular que detectan presiones y cargas mecánicas dinámicas, además regulan ciertas actividades entre osteoblastos-osteoclastos y participan en la regulación de la homeostasis del calcio y el fósforo. Por otra parte, los osteoclastos son los encargados de

reabsorber la laguna ósea y disolver los cristales de hidroxiapatita, teniendo un papel primordial en la remodelación ósea(17,20)

Como se acaba de describir, el hueso es un tejido muy complejo, por lo que una fractura ósea se considera una lesión de importancia médica, ya que son las lesiones traumáticas más comunes en humanos. Existen diferentes tipos de defectos óseos provocados por diversos motivos (accidentes, enfermedades, tumores, síndromes, etc), algunos de estos defectos se regeneran de manera exitosa sin ningún tipo de injerto, prótesis o andamio; sin embargo, desafortunadamente, alrededor del 5 al 10 % de las fracturas provocan una cicatrización tardía o falta de unión, afectando la funcionalidad, del hueso en esa zona, agravando el problema en el caso de pacientes con comorbilidades como la diabetes. En la actualidad los principales tratamientos para la regeneración ósea se encuentra el uso de injertos, autoinjertos (que promueve la osteogénesis), aloinjerto (osteoinducción) y xenoinjertos (osteoconductores). Sin embargo, existen inconvenientes en el tratamiento de autoinjerto se encuentra limitado por el volumen de hueso que se puede obtener de la cresta ilíaca para posteriormente colocarlo en el sitio del defecto. Las complicaciones incluyen morbilidad en el sitio de recolección, hematoma local y problemas de remodelación del hueso implantado. El aloinjerto y xenoinjerto se ven obstaculizados por la integración del tejido óseo del huésped y los problemas de vascularización (21,22). Por lo tanto, la ingeniería de tejidos óseos ha surgido como una necesidad para promover la regeneración ósea óptima.

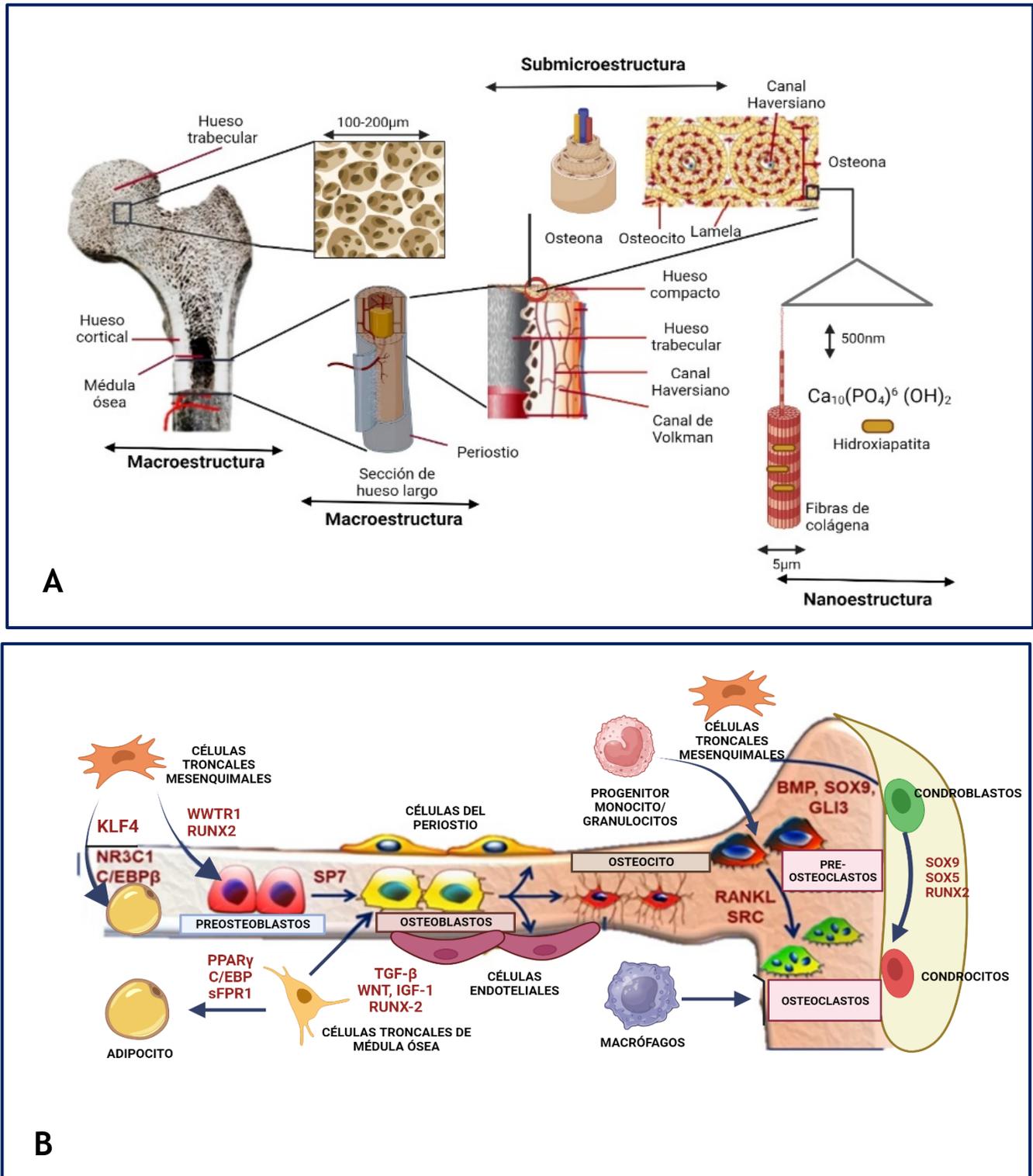


Figura 1. Hueso. A) Estructura jerárquica del tejido óseo (macroestructura-nanoestructura). B) Células que integran el hueso (células troncales mesenquimales, pre-osteoblastos, osteoblastos, osteocitos etc). Esta figura fue modificada de *Bisht et al.* (3). Creada con BioRender.com

1.2 Ingeniería de tejidos óseos y andamios

Antes de describir a la ingeniería de tejidos óseos, es importante definir el concepto de medicina regenerativa, donde de acuerdo con *Deguchi et al.*(1) es un campo que incluye varias disciplinas (biológicas, moleculares, biomateriales e ingeniería de tejidos, entre otras), teniendo como principal estrategia, la creación de tratamientos enfocados en regeneración de tejidos u órganos dañados por diferentes circunstancias. Por otro lado, la ingeniería de tejidos es una de las estrategias más utilizadas en la medicina regenerativa, la cual fue descrita en 1993 por *Lager et al.* (23) la define como “Un campo interdisciplinario donde interviene el área de ingeniería y de las ciencias de la vida, hacia el desarrollo de substitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función tisular o el órgano completo” (22). Mientras que la ingeniería de tejidos óseos se especializa en desarrollar estrategias para regenerar defectos óseos de tamaño crítico, causados por algún traumatismos , tumor, síndrome o enfermedad, donde la innovación de los andamios, el uso de células y factores biológicos son indispensables (24,25). La ingeniería de tejidos óseos, busca crear entornos biomiméticos para optimizar la regeneración ósea de esta forma, no solo puede reparar y/o regenerar el hueso dañado, sino también superar las limitaciones de los tratamientos clínicos actuales(26) Para que la ingeniería de tejidos óseos sea óptima, debe considerar, la estructura del hueso, su fisiología y la mecánica ósea, requiriendo la colaboración de cirujanos, científicos e ingenieros. Por tal motivo, es una alternativa prometedora para superar las limitaciones de los tratamientos clínicos actuales como rechazos, patogenicidad, suministro limitado, período de almacenamiento limitado hasta el trasplante y condiciones de transporte como baja temperatura (27)

Existen diferentes requisitos que deben cumplir los materiales que se utilizan en la ingeniería de tejidos óseos, dentro de ellos se encuentra la fuerza y estímulos mecánicos, donde se busca que los substitutos óseos ideales deban imitar estas propiedades del tejido natural. Los estímulos mecánicos que impactan sobre los andamios, juegan un papel importante en la ingeniería del tejido óseo, tienen un efecto en la proliferación celular, la diferenciación inducida de células troncales, la deposición de minerales en la matriz y otros (28)

Otros requisitos importantes en los andamios son la porosidad, el tamaño de poro y la topografía, son parámetros cruciales para los materiales de andamiaje utilizados en la ingeniería de tejidos óseos, ya que están relacionado en la adhesión, migración e incluso

diferenciación celular. Por otro lado, una red porosa interconectada es necesaria para la circulación de los fluidos corporales, se recomienda una porosidad entre 40 % - 80 % y un tamaño de canal de poro interconectado entre 100 μm y 200 μm para diversas aplicaciones de ingeniería de tejidos; sin embargo, no existe un consenso del tamaño poro ideal, los rangos se encuentran entre los 100 μm -1000 μm , teniendo en cuenta que los tamaños de poros más pequeños funcionan como señalizadores para las células, mientras que los poros más grandes están relacionados a la vascularización y prevenir la hipoxia en la región interna. Por lo tanto, se sugiere que el tipo de material o andamiaje permita tener tamaños de poros diferentes es decir porosidad heterogénea o graduada esto hace indispensable, la selección de la técnica de fabricación adecuada que permite dichas características (29).

Por otra parte, existen estudios que comprueban que las superficies con microrrugosidad y la ampliación de superficie son mejores para ayudar a la integración de tejido duro desencadenada por osteoblastos en comparación con las superficies lisas(30). Además, la arquitectura del andamio se puede diseñar específicamente para sitios con defectos óseos en la impresión 3D, utilizando varios métodos basados en imágenes, como la tomografía o microtomografía y métodos de modelado matemático, como el modelado de superficies implícitas.

Como requisito general para un material de andamio, debe ser biocompatible, biodegradable y biorreabsorbible. Específicamente, para la ingeniería de tejido óseo se requieren materiales que fomenten la osteointegración que sean osteoinductivos y osteoconductores. Además, está aumentando la investigación del uso de biomateriales o recubrimientos antibacterianos, para prevenir infecciones, así como el uso de la inmunobioingeniería, la cual es una estrategia ideal para modular el sistema inmunológico(27).

En la triada de la ingeniería de tejidos óseos (andamios, células y moléculas bioactivas) la elección del tipo de célula adecuada para sembrar en los andamios es un desafío, ya que se requiere la capacidad de diferenciarse así como secretar moléculas bioactivas que posean funciones osteogénicas y neovasculares necesarias para la reparación ósea, por lo que el uso de células troncales mesenquimales (MSC) suelen ser la primera elección, ya que permiten acelerar el proceso de regeneración, pueden secretar moléculas bioactivas, quimioatrayentes, angiogénicas, inmunomoduladoras y antiapoptóticas (27), sus funciones se describirán con mayor detalle más adelante.

Por otra parte, las moléculas bioactivas también son ampliamente utilizadas en ingeniería de tejidos, estas moléculas son principalmente factores de crecimiento, péptidos, hormonas y ácidos nucleicos estos se incorporan en los biomateriales para promover la reparación ósea. Las moléculas pequeñas también se están utilizando como agentes inmunomoduladores, antiinflamatorios y antibacterianos (27,31)

Finalmente, todas estas características conforman la ingeniería de tejidos, donde el uso de los andamios adquiere un papel crucial. En la figura 2 se resumen las principales características que debe tener un andamio sintetizado para la regeneración ósea(32).

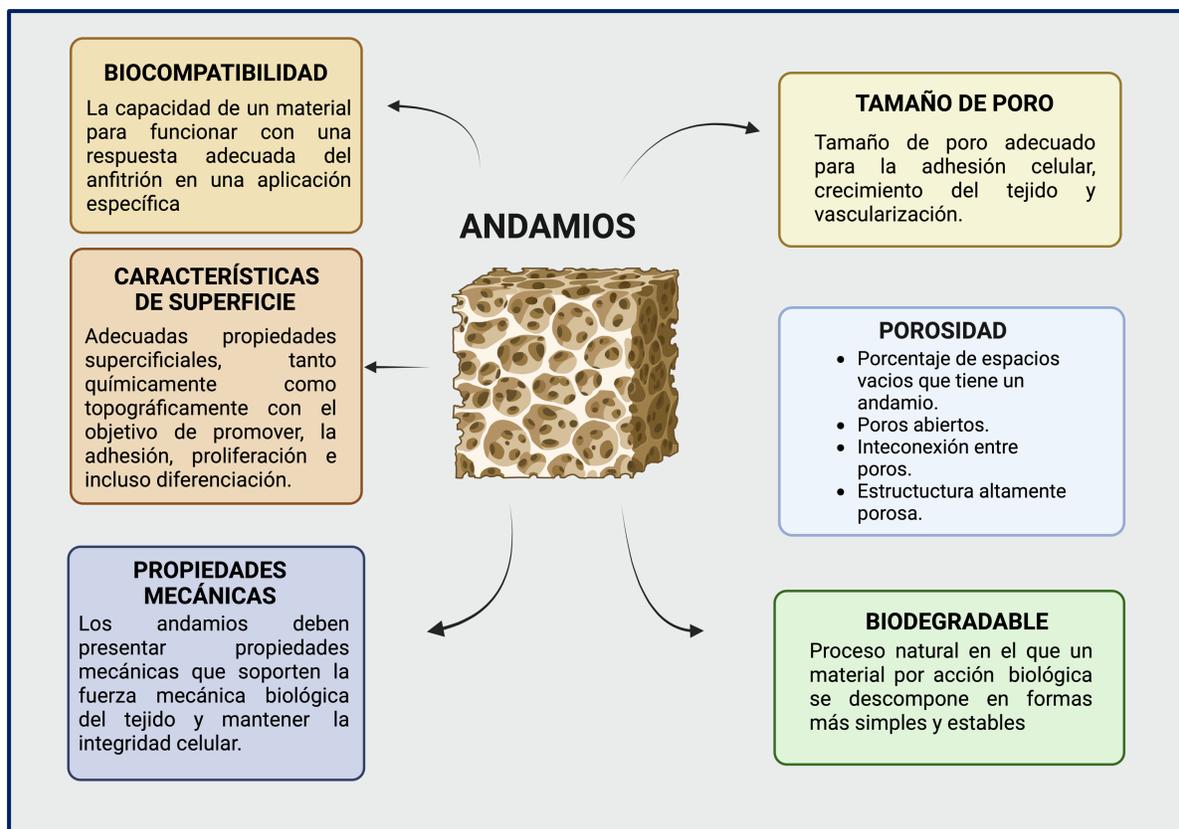


Figura 2. Características de los andamios en la ingeniería de tejidos. Esta figura fue modificada de King et al. (15). Creada con BioRender.com

Existen diferentes técnicas de fabricación de andamios tridimensionales (3D), dentro de ellas se encuentran: el electrohilado, lixiviación de partículas, la formación de espuma con gas y la separación de fases. Sin embargo, para uso clínico estas técnicas presentan el inconveniente de no permitir el uso de imágenes médicas para la fabricación de andamios

personalizados, además con estas metodologías no se puede controlar el tamaño y forma de los poros. Por lo que la Manufacturación Aditiva (MA) o impresión 3D ha surgido como una alternativa valiosa, por permitir imprimir andamios personalizados y con arquitecturas complejas.

1.3 Técnicas de impresión 3D

La impresión 3D o Manufacturación Aditiva es una técnica de fabricación de andamios 3D ampliamente utilizada en la ingeniería de tejidos, debido a sus diversos beneficios. Uno de ellos es que permite la combinación de diferentes tipos de materiales (híbridos), creando andamios con estructuras biomiméticas. Por otro lado, varios tamaños y sitios de defectos óseos requieren una técnica de fabricación fácilmente adaptable y rentable para proporcionar andamios que coincidan con la forma anatómica del defecto óseo. Además, es capaz de fabricar componentes físicos funcionales con o sin porosidad depositando los materiales capa por capa utilizando modelos digitales 3D, por lo tanto, facilita la producción de andamios óseos avanzados, con la posibilidad de realizar cambios en el modelo(33). El proceso de impresión 3D de un andamio para la regeneración de un defecto óseo, lleva un proceso o flujo digital, el cual empieza con la adquisición de imagen del defecto óseo, a partir de técnicas como la tomografía computarizada (TC) o la resonancia magnética nuclear (RMN). Después de su adquisición, las imágenes médicas se almacenan como archivos de imágenes digitales y comunicaciones en medicina (DICOM). Para generar un archivo 3D compatible con las impresoras, las imágenes DICOM se pueden manipular utilizando paquetes de software de segmentación y post-procesamiento. La mayoría de los paquetes de software crean automáticamente un archivo de estereolitografía (STL) después de completar la segmentación de las imágenes DICOM individuales. Con los archivos STL, los usuarios pueden definir la cantidad de triángulos que componen cada superficie, un número inadecuado de triángulos o "facetas" dará como resultado un modelo anatómicamente inexacto (33). A pesar de ser compatible con las impresoras 3D, el archivo STL generado a menudo requiere modificaciones antes de que esté listo para imprimirse, a partir de este paso se pueden diseñar el andamio óseo en el modelo anatómico, utilizando un software de diseño asistido por computadora (CAD), una vez diseñado el andamio se transforma en formato G-CODE el cual contiene las instrucciones motoras que la impresora 3D debe seguir (véase figura 3).

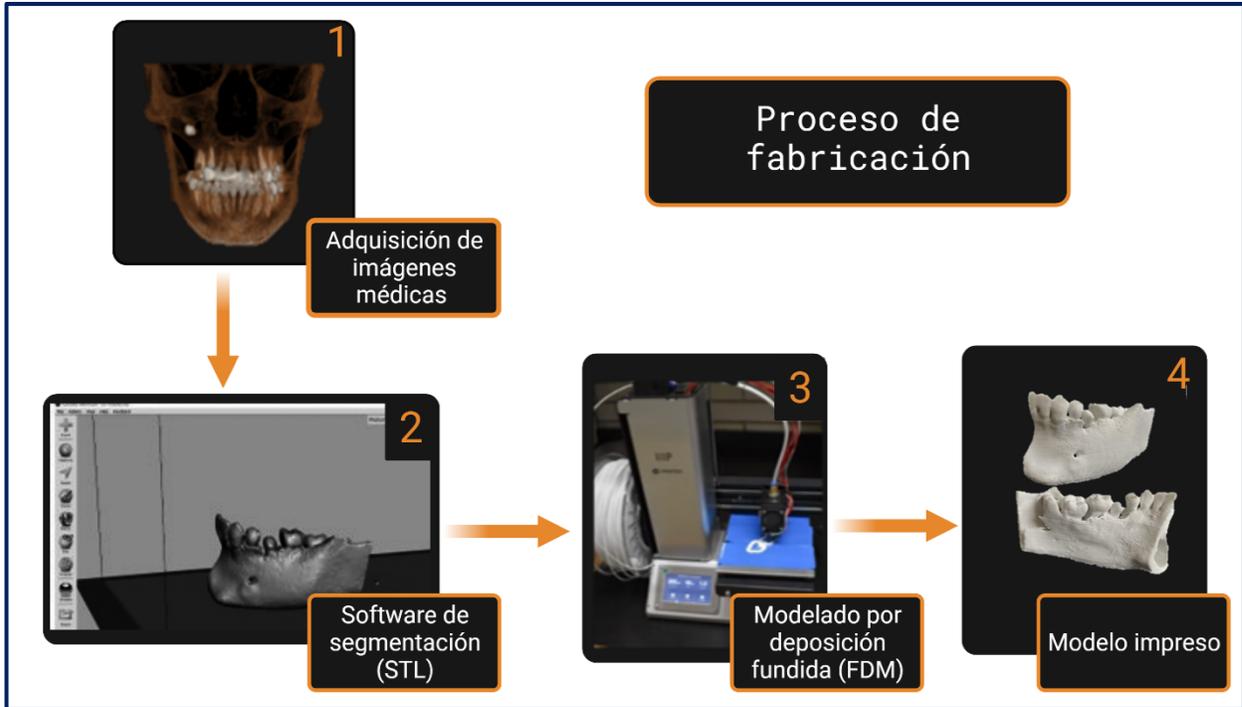


Figura 3. Proceso de fabricación (flujo de trabajo). 1.- Adquisición de imágenes médicas en formato DICOM. 2.- Transformación de la imagen 3D en formato STL. 3.- Impresión del modelo 3D, en formato G-Code. 4.-Modelo impreso 3D con polímero de ácido poliláctico (PLA). Figura creada con BioRender.com

Las principales técnicas de Manufacturación Aditiva son las siguientes (véase figura 4).

1.3.1 Estereolitografía (SLA)

El proceso SLA fue la primera tecnología de Manufacturación Aditiva, patentado en Estados Unidos por Charles Hull en 1984 y comercializado por 3D Systems, Inc. Actualmente, el proceso SLA es reconocido como uno de los métodos de impresión 3D más investigados y aplicados en el mundo(34). La técnica de estereolitografía (SLA) utiliza un láser de luz ultravioleta (UV) o un proyector DLP para polimerizar capa por capa el material líquido que es una resina fotocurable. La capa de resina fotosensible se encuentra en un tanque de impresoras 3D, durante el proceso de impresión se crea una capa sólida muy delgada cuando la resina se endurece con la fuente de luz. Esta rebanada se adhiere a la plataforma o a la capa que se generó previamente (35), se adicionan mediante patrones bidimensionales por un rayo láser guiado. Después de eso, la plataforma de fabricación desciende los patrones en la parte superior de la polimerización de la capa anterior para formar la estructura deseada(34,35).

Debido al hecho de que se utiliza una fuente de luz para endurecer el material, la impresión SLA da como resultado impresiones más pequeñas y una resolución más alta que la impresión de Modelado por Deposición Fundida (FDM). El tamaño de la fuente de luz determina la resolución horizontal de un escáner SLA, que puede estar entre 30 y 140 micras. La resolución en dirección Z, a menudo conocida como resolución vertical, oscila entre 25 y 200 micras. La altura de la capa y la posible ubicación del soporte deben configurarse correctamente para producir una impresión de alta calidad(35).

1.3.2 Modelado por Deposición Fundida (FDM)

En 1988, Scott Crump, un académico estadounidense, propuso por primera vez el proceso de modelado, pero fue hasta 1991 que desarrolló la primera máquina de FDM y propuso su aplicación comercial (34), por lo cual ha sido ampliamente utilizada desde entonces.

Esta técnica consiste en extruir y depositar un polímero termoplástico en forma de filamento a través de una boquilla que se encuentra a temperaturas elevadas, el material se coloca sobre la placa de impresión y se va depositando el material capa por capa hasta crear un modelo tridimensional. La boquilla se mueve en las direcciones X e Y mientras imprime la forma estructural de una capa y luego se mueve en la dirección Z para imprimir diferentes capas del andamio. Cada capa se enfría y se solidifica en el proceso de unión a la capa anterior (36). Por otro lado, en comparación con las otras técnicas de impresión la FDM es de bajo costo, no utiliza solventes orgánicos, de fácil manipulación y permite el uso de polímeros biocompatibles como el ácido poliláctico (PLA) y la policaprilactona (PCL); sin embargo, tiene menor resolución, aproximadamente de 100 micras, por lo que el uso de esta técnica en la fabricación de objetos con estructuras complejas o de tamaños muy pequeños es una limitante; además, presenta la incapacidad de imprimir ciertos componentes (como células/proteínas junto con andamios) debido a la presencia de altas temperaturas(36). Por lo general, se utilizan dos materiales durante el proceso de construcción, uno que sirve como material de soporte y el otro que constituye el material de construcción real. Además, se puede modificar la temperatura de la boquilla, el diámetro, la velocidad de movimiento, la velocidad de extrusión y la dirección de construcción(34).

1.3.3 Sinterización selectiva por láser (SLS)

La tecnología SLS fue desarrollada por Carl Dechard en la Universidad de Texas en Austin en 1989. La sinterización selectiva por láser (SLS) es un método que consiste en el uso de rayo láser que sinteriza el material que se encuentra en forma de polvo, este material puede ser (polvo de nailon, polvo de vidrio, polvo de cera, polvo de metal, polvo de cerámica y polvo de cera metálica recubierta, etc.) El polvo se suministra en la impresora SLS mediante rodillos de polvo y se distribuye en capas finas en la plataforma de construcción. Cuando se irradia con un rayo láser, el rayo derrite el polvo en un patrón específico, luego baja la plataforma y deposita el polvo fresco sobre el patrón fundido. La irradiación posterior del polvo fresco da como resultado la formación de la siguiente capa del objeto 3D (34,36).

Existe una variedad de máquinas SLS disponibles en el mercado con diferentes variaciones en el tipo de láser (CO₂, ND:YAG o fibra), tipo de atmósfera inerte (basada en argón o nitrógeno) y método de deposición (usando rodillo o raspador). Las principales ventajas de usar el método SLS son la capacidad de controlar el tamaño de poro, fácil control del usuario, capacidad de diseñar andamios complejos con formas anatómicas. Mientras que dentro de sus principales desventajas son el alto costo económico, acondicionamiento especial de lugar de trabajo, son la escasa rugosidad de la superficie, la baja tasa de biodegradabilidad de los andamios, la alta tensión residual y la distorsión en las estructuras impresas. El rayo láser de un SLS típico usa un diámetro de 0,3 mm y construye los andamios derritiendo y fusionando polvos metálicos, a lo largo del eje Z(36).

Existen otras técnicas de manufacturación aditiva (MA), derivadas de las tres principales descritas con anterioridad como Polyjetting, que se caracteriza por el uso de una tinta con una metodología similar a las impresoras 2D comercial donde la extrusora deposita pequeñas gotas de un material de fotopolímero seleccionado en la cama, que luego se polimeriza con luz ultravioleta(37). La Proyección de luz digital (DLP), consiste en un método de impresión 3D asistido por luz ultravioleta, con el uso de un dispositivo de microespejo digital giratorio, la luz se proyecta sobre un polímero fotosensible (36). La Impresora de aglutinante en polvo es otra técnica que consiste en utilizar gotas de adhesivo líquido dentro de un cabezal de inyección de tinta modificado. El cabezal de inyección de tinta libera estas gotas para que se infiltren en una capa de polvo. Este paso se repite reponiendo una nueva capa de polvo hasta que se fabrica el producto final(37). Litografía axial computarizada, es una técnica de impresión que emplea un proyector como fuente de

luz para fotopolimerizar la resina. La diferencia entre la litografía axial computarizada y otras técnicas de impresión convencionales es que la polimerización ligera se aplica en varios ángulos al material(37). En otras palabras, la litografía axial computarizada puede producir todo el objeto a la vez (no capa por capa). Mientras que la bioimpresión de inyección de tinta, utiliza una solución de hidrogel que tiene células encapsuladas para imprimir los andamios. La biotinta sale del cartucho y el actuador térmico o piezoeléctrico la comprime para formar gotas (36). Finalmente, la bioimpresión criogénica se caracteriza porque la biotinta permanece sumergida en un refrigerante como el nitrógeno líquido. La idea clave detrás de la impresión 3D criogénica es transformar un gel en estructuras de estado sólido, estables y congeladas que carecen de cualquier deformación inducida por la gravedad(36). Existen una gran variedad de materiales para cada técnica de impresión 3D; sin embargo, dentro de los más utilizados se encuentran biopolímeros naturales/sintéticos, biocerámicas (fosfato beta-tricálcico, hidroxiapatita y vidrio bioactivo, normalmente se combinan con algún polímero) y aleaciones metálicas (a base de titanio, tantalio u otras aleaciones metálicas)(36).

Por otro lado, uno de los retos más importante dentro de la impresión 3D, se encuentra la bioimpresión, la cual se caracteriza por incluir células o proteínas en el interior de sus materiales, permitiendo que sus características reológicas mantengan viables las células durante el proceso de impresión. Los principales materiales, utilizados como biotintas son los hidrogeles utilizando polímeros naturales (polisacáridos o proteínas), polímeros sintéticos o incluso una combinación de ambos. Algunos de los polímeros comúnmente utilizados en el hidrogel con alginato, agarosa, quitosano, gelatina, polietilenglicol (PEG) y Acetato de Polivinilo (PVA). Sin embargo, aún es un área de investigación, ya que muchos de ellos necesitan fotoiniciadores y entrecruzantes que pueden afectar la bioactividad de la tinta. Además, un problema importante asociado con los andamios de hidrogel sembrados con células, es el lento proceso de expansión de las mismas(36,38).

En el siguiente capítulo, se describirá a mayor profundidad el tema de los polímeros que son los materiales utilizados en este trabajo.

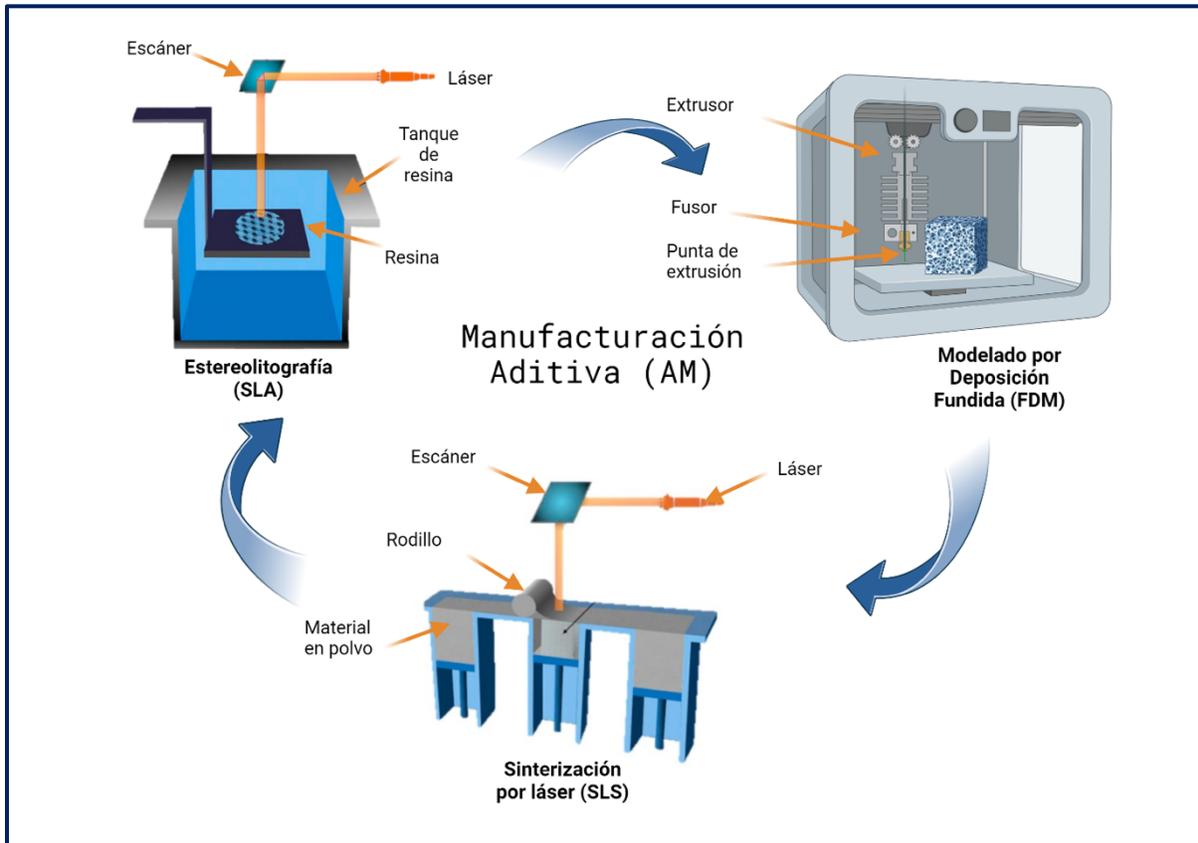


Figura 4. Manufacturación Aditiva. Tres técnicas principales de impresión 3D (Estereolitografía, Modelado por Deposición Fundida y Sinterización por láser). Esta figura fue modificada de *Su et al.* (20). Creada con BioRender.com

1.4 Polímeros usados en la impresión 3D

Existen diferentes polímeros utilizados en la ingeniería de tejidos óseos para la impresión de andamios impresos en 3D, estos polímeros se clasifican en naturales y sintéticos. Los polímeros naturales más utilizados son gelatina, colágena, alginato y quitosán.

Por otro lado, se encuentran los polímeros sintéticos que permiten la combinación con los polímeros naturales. Dentro de estos polímeros sintéticos se encuentra alcohol polivinílico (PVA) el cual es un termoplástico, soluble en agua y biorreabsorbible, utilizado con la técnica de impresión FDM; sin embargo, normalmente necesita la adición de otro polímero como el ácido poliláctico (PLA) para soportar las altas temperaturas de la técnica de impresión. Otro polímero termoplástico es el poliuretano (PU), con una excelente biocompatibilidad, se imprime con la técnica FDM y es ampliamente utilizado en el área médica. En el área de la ingeniería de tejidos, se puede utilizar como biotinta, cuando se

combina con policaprolactona (PCL). El polímero PCL es de los termoplásticos más utilizados en el área de la ingeniería de tejidos, aprobado por la FDA, debido a sus características biológicas como su biocompatibilidad, flexibilidad, fácil procesamiento, no citotóxico, bioreabsorbible. Sin embargo, su hidrofobicidad no favorece la adhesión celular, por lo que regularmente necesita un tratamiento para volver la superficie hidrofílica, también exhibe alta energía de fracturas. A continuación, describiremos las características del polímero ácido poliláctico (PLA) ya que es otro de los polímeros que se utiliza en la técnica FDM (41,42).

1.4.1 Características del ácido poliláctico (PLA)

El ácido poliláctico (PLA) es poliéster, fabricado por primera vez en la década de 1930 por Wallace Carothers, un químico estadounidense muy conocido. Sin embargo, no fue hasta la década de 1990 que fue comercializado a mayor escala debido a sus características físicas, mecánicas y térmicas. Actualmente, el PLA se utiliza ampliamente en varios sectores, en el procesamiento de alimentos, textiles, agricultura, cosméticos y médicos. En el área médica se amplía más su uso, debido a su naturaleza biodegradable, biocompatible, propiedades mecánicas favorables para tejidos duros, no toxicidad y biorreabsorbible. Sin embargo, dentro de sus desventajas se encuentran su baja resistencia al calor, a la fuerza de compresión y su superficie hidrofóbica (39,40).

1.4.2 Síntesis del PLA

El compuesto base para producir PLA es el ácido láctico. El ácido láctico (LA) existe en dos isómeros, en forma levorrotatoria (ácido láctico D o R (-)) y forma dextrorrotatoria (ácido láctico L o S (+))(40). Dado que el LA es una molécula quiral con isómeros tipo D y tipo L, se forman tres formas de ácido poliláctico: ácido poli- L -láctico (PLLA), ácido poli- D-láctico (PDLA) y poli- D, L -ácido láctico (PDLLA)(39). El ácido láctico obtenido del músculo animal es ácido láctico dextrorrotatorio (L-LA), mientras que el ácido láctico obtenido por fermentación es ácido láctico levorrotatorio (D-LA). Los frijoles, los guisantes, el maíz, la remolacha azucarera, la leche de soya y las papas son algunas de las principales fuentes de L-LA. En aplicaciones biomédicas, se prefiere L-LA; por otra parte, el PLA también se sintetizan a partir del LA varios productos químicos, por ejemplo, propilenglicol, ácido acrílico y acetaldehído(39,41). El ácido láctico es una molécula sin carga, de tamaño pequeño, que permite atravesar las membranas lipídicas de las células, al llegar al núcleo

a través de un transportador monocarboxilato, sirven como antioxidantes, protegiendo de daño celular(39).

La síntesis de PLA se puede llevar a cabo por tres procesos: 1.- Policondensación directa, 2.- Condensación deshidratante y 3.- Polimerización por apertura de anillos.

La policondensación directa, se divide en dos pasos. El primer paso es la condensación por deshidratación de grupos hidroxilo y carboxilo para producir ácido poliláctico de bajo peso molecular. A continuación, se deben agregar agentes de acoplamiento y adyuvantes de esterificación. Su adición puede modificar el PLA y ayudar a amplificar la cadena. Este proceso es bastante fácil de realizar, pero rara vez se prefiere debido a que la humedad atrapada en el polímero viscoso fundido conduce a una disminución del peso molecular total del polímero y las impurezas en el proceso de reacción no se pueden degradar en el cuerpo, lo que puede causar serias complicaciones en aplicaciones médicas(40,41)

Para producir PLA de alto peso molecular, se realiza una condensación deshidratante azeotrópica, este proceso se caracteriza por evitar el uso de adyuvantes; sin embargo, es un proceso lento y requiere solventes de puntos de ebullición más altos como ácidos dibásicos y glicoles, para la eliminación de moléculas disociativas de agua del compuesto PLA. El ácido láctico se destila a presión reducida a una temperatura de 130 °C, durante 2-3h, posteriormente, se añade a la reacción un catalizador y éter difenílico, posteriormente, se pasa a través de un tamiz molecular y se devuelve al recipiente durante otras 30 a 40 horas a una temperatura de 130 °C. A continuación, el polímero puede separarse o disolverse y precipitarse para una mayor purificación. Como se acaba de explicar los tiempos de reacción son muy largos y el uso de solventes inorgánicos hacen que este proceso sea muy inadecuado, ya que puede provocar daños irreversibles al cuerpo humano, por lo que no puede aplicarse en el campo médico(39,41).

Otro método de convertir LA en PLA de alto peso molecular, es la polimerización por apertura de anillo (ROP). En este proceso, el LA deshidratado y condensado se convierte en oligómeros a alta temperatura (115–179°C) y baja presión, liberando así el exceso de humedad de la molécula de cadena pequeña de PLA. La lactida tiene tres configuraciones estereo: L-lactide, mesolactide y D-lactide, en este proceso se forman mesolactidas. A partir de entonces, se lleva a cabo la despolimerización de las mesolactidas a una temperatura superior al punto de fusión de las lactidas, pero inferior a la temperatura de degradación del

PLA, lo que da como resultado el rendimiento de ácido poliláctico de alta pureza óptica. El PLA extraído en ROP se convierte en pellets tras su cristalización(39,41).

1.4.3 Propiedades del PLA

Características físicas y mecánicas

El ácido poliláctico polimérico posee buenas características físicas en cuanto a brillo, transparencia y resistencia al calor. Presenta propiedades de termoplasticidad, barrera a los gases, resistencia a los rayos UV, elasticidad, rigidez, hidrofobicidad y biocompatibilidad. Sin embargo, el PLA tiende a ser quebradizo y presenta una temperatura de cristalización alta y una tasa de cristalización lenta, lo que afecta su tiempo de fabricación. El alto número de enlaces éster en el PLA lineal lo convierte en un material de baja hidrofilia y baja resistencia al impacto, restringiendo sus aplicaciones y dando lugar a esfuerzos para superar estas desventajas sin causar una gran pérdida en el rendimiento del material(42). La disolución del PLA depende de su grado de cristalinidad; los polímeros amorfos son solubles en varios disolventes orgánicos, incluidos la acetona, el acetonitrilo y el cloruro de metileno. Además, el PLA cristalino solo se puede disolver en diclorometano o benceno a altas temperaturas. El PLA presenta un carácter hidrofóbico, una temperatura de fusión (T_m) de 120-170 °C, temperatura de transición vítrea (T_g) 54-56 °C, es un polímero semicristalino y tiene al 37 % de cristalinidad. Dentro de sus características mecánicas, presentan un módulo de flexión de 345-450 MPa, un módulo de tracción de 3.5 GPa y una resistencia a la tracción de 52 Mpa(40,43).

Aplicaciones médicas del PLA

El PLA ha sido ampliamente utilizado en el área médica como suturas quirúrgicas, implantes médicos, sistema de administración de fármacos, tornillos de fijación, prótesis, guías quirúrgicas, revestimiento de membranas, cosméticos y andamios para ingeniería de tejidos.

Una de las aplicaciones más novedosas se encuentra en el sistema de administración de fármacos (DDS). El PLA ha mostrado un gran potencial, para evitar la degradación enzimática de los fármacos, cuando se exponen a un entorno biológico. Se han desarrollado varios sistemas como transportadores de fármacos donde se utiliza el polímero PLA, por ejemplo, en microcápsulas (MC), dosis, pellets y nanopartículas (NP) debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, resistencia y solubilidad a varios solventes. Algunos

estudios describen el uso del PLA en forma de micropartículas (MP) o nanopartículas (NP) para liberar proteínas, moléculas de ADN/ARN. Además de esto se ha demostrado que las MP y las NP son partículas muy pequeñas que pueden penetrar a través de las barreras biológicas. Las MC a base de ácido poliláctico se aplican ampliamente en la administración de fármacos para administración prolongada en una gran variedad de agentes médicos como anestésicos locales, vacunas y anticonceptivos(39,44,45).

Los implantes de polímeros biodegradables, particularmente los de PLA, han surgido debido a las desventajas que presentan los implantes metálicos como la alta corrosión, la alta densidad y la baja biocompatibilidad. En la actualidad, se utilizan satisfactoriamente como material de fijación de fracturas óseas (placas y tornillos). Para aplicaciones ortopédicas, se han fabricado películas de PLA que mostraron una buena compatibilidad con fibroblastos, células del tabique nasal y células de osteosarcoma(39). Además de esto han aumentado las investigaciones del uso del PLA en la formación de biocomposites debido a sus ventajas, como la degradación espontánea en medio fisiológico, lo que evita la extracción de implantes por segundas cirugías o la permanencia de los implantes en el cuerpo humano(42).

Ácido poliláctico (PLA) e ingeniería de tejidos

Con los desarrollos recientes en la ingeniería biomédica, los biomateriales basados en PLA han ganado su lugar en la ingeniería de tejidos. Los biopolímeros más utilizados para andamios se encuentra el PLA, ácido poliglicólico (PGA), poliácido láctico-co-glicólico (PGLA) y policaprolactona (PCL), aprobados por la FDA(39).

Por otro lado, una de las características más importantes de los andamios es permitir la adhesión celular, en este caso el PLA es hidrofóbico y tiene una tasa lenta de degradación en un medio acuoso, por tal motivo los andamios de PLA suelen utilizarse en combinación con otros polímeros, es decir una copolimerización o también una incorporación de nanopartículas para formar fibras de nanocompuestos, el objetivo principal de esta combinación es mejorar su degradabilidad, biocompatibilidad y propiedades mecánicas(40). Dentro de algunos ejemplos de estas modificaciones están descritos por *Zhang et al.* (46) que prepararon compuestos de nanodiamantes funcionalizados con PLA/octadecilamina (ND-ODA) para su uso en la ingeniería de tejidos, mejorando las propiedades del PLA. *Shim et al.* (47) sintetizaron un andamio PLLA microfibroso 3D fabricado utilizando técnicas de electrohilado, los resultados *in vivo* mostraron que las

matrices microfibras electrohiladas 3D proporcionaron un sustrato favorable para la infiltración celular y la formación de hueso. *Lauer et al.* (48) imprimieron andamios de PLA cargadas con factor derivado del estroma (SDF-1) liberando constantemente el SDF-1, favoreciendo el crecimiento de las células endoteliales e inducen la formación de neovasos. Estos resultados demostraron el potencial de los andamios PLA impresos en 3D en la regeneración del tejido óseo. Los andamios biodegradables impresos en 3D podrían ser los sustitutos óseos ideales para uso clínico, siempre que posean una capacidad de vascularización rápida, una bioactividad sólida de osteoinducción y una resistencia mecánica favorable. Muy recientemente, se desarrolló un enfoque de ingeniería de superficies para mejorar la actividad osteogénica de los andamios de PLA/hidroxiapatita impresos en 3D(49). Estos andamios 3D se funcionalizaron con polietilenimina y ácido cítrico, posteriormente se modificaron con materiales minerales CaP. Los compuestos basados en PLA se han utilizado como materiales para clips óseos. *Yeon et al.* (50) desarrolló con éxito clips óseos de PLA, PLA/hidroxiapatita y PLA/hidroxiapatita/seda impresos en 3D que mostraron propiedades mecánicas similares y una biocompatibilidad superior con otros tipos de clips óseos. Estos resultados confirmaron que los clips óseos derivados de PLA pueden actuar como un posible dispositivo de fijación interna en el hueso fragmentado(39).

1.5 Mecanismo de degradación de polímeros

El uso de los polímeros naturales y sintéticos, en el área de la ingeniería de tejidos ha ido en aumento, y ha surgido la necesidad de buscar métodos de degradación de dichos polímeros, para disminuir la huella ecológica que provocan, y acelerar el tiempo de degradación si son utilizados como implantes o andamios en el cuerpo humano.

Existen diferentes técnicas de degradación como: térmica, foto-oxidativa, mecánica, biológica, por irradiación, química y mecánica. Se han utilizado productos químicos como disolventes, líquidos iónicos debido a sus propiedades únicas e interacciones estructurales para la degradación(51).

Los principales factores que causan la degradación son el calor, la fuerza mecánica, la radiación y el ozono que conducen a diversos tipos, como la degradación térmica, termo-oxidativa, fotodegradación, química, biológica, hidrolítica y por irradiación. En un proceso de degradación se lleva a cabo una reacción que consiste en una serie de pasos.

El primer paso es la despolimerización que consiste en producir una baja actividad de radicales libres al final de la cadena del polímero. El cambio en la cadena molecular es lento, debido a que los monómeros se pierden uno por uno por cadena polimérica según el mecanismo de reacción.

Segundo paso es la escisión aleatoria de la cadena, consiste en la disminución rápida del peso molecular debido a que se rompe al azar la cadena principal del polímero, provocando la formación de nuevos radicales libres que tienen una alta reactividad.

El tercer paso consiste en la eliminación de grupos laterales. Los enlaces que conectan la columna principal son mucho más fuertes que los enlaces que conectan los grupos laterales a la cadena principal. Cuando se produce la despolimerización, los grupos laterales se eliminan de la cadena principal, acelerando así el proceso de degradación del polímero(51,52).

1.6 Degradación hidrolítica del PLA

Como se describió con anterioridad el ácido poli- L-láctico (PLLA) y el ácido poli- d -láctico (PDLA) se forman después de la polimerización de monómeros de ácido l-láctico y ácido d -láctico ópticamente activos respectivamente. El L-lactide es un isómero natural y está más fácilmente disponible en comparación con su contraparte D-lactide. PLLA es un polímero de degradación más lenta en comparación con otros poliésteres alifáticos como el ácido poliglicólico (PGA). Esto se atribuye a los voluminosos grupos metilo presentes en la cadena principal que son responsables de su superficie hidrófoba inicial, lo que retrasa la degradación hidrolítica inicial. El ácido poliláctico (PLA) tiene suficiente estabilidad térmica para retardar la degradación y mantener el peso molecular. A temperaturas superiores a 200 °C, el ácido poliláctico sufre hidrólisis, recombinación de lactida, escisión oxidativa de la cadena principal y transesterificación intermolecular o intramolecular (53). Por otro lado, se ha observado que los implantes de PLA de mayor peso molecular permanecen de dos a cinco años antes de que se reabsorban totalmente *in vivo*(52). No obstante, la tasa de degradación depende en gran medida del grado de cristalinidad del material, así como de la porosidad y espesor del implante; sin embargo, existe literatura que reportan otros factores como el tiempo, la temperatura, las impurezas de bajo peso molecular y la concentración del catalizador (52). Los estudios encontraron que la simple modificación del polímero puro afecta la degradación. En ambientes acuosos, los polímeros naturales tienden a perder parte de su resistencia y módulo elástico en los primeros seis meses

debido a la acción plastificante del agua y, por lo tanto, no se producirán cambios significativos en la masa hasta mucho más tarde. Por lo tanto, actualmente se están estudiando copolímeros de L-lactidas o D-lactidas con glicólidos con el objetivo de desarrollar polímeros con una gama más amplia de propiedades. Dado que la degradación hidrolítica depende del entorno circundante, el pH juega un papel fundamental en la determinación de la tasa de degradación del PLA (52). Se han realizado varios estudios, donde se ha demostrado que la tasa de degradación hidrolítica de PLA está relacionada con el pH, que puede afectar tanto el mecanismo de degradación como la cinética. En un pH ácido el PLA se degrada de manera acelerada en comparación con pH alcalino o neutro(12,51).

Inicialmente, la hidrólisis de los enlaces éster procede preferentemente en las regiones amorfas de la matriz del PLA . Durante la degradación, dos factores son de importancia, en primer lugar, la degradación provoca un aumento en el número de extremos de cadena de ácido carboxílico, que actúan catalíticamente para afectar la degradación hidrolítica del PLA en un proceso autocatalizado y automantenido. En segundo lugar, solo los oligómeros que son solubles en el medio acuoso circundante pueden escapar de la matriz. A medida que avanza la degradación, los oligómeros solubles que están cerca de la superficie pueden filtrarse antes de que se degraden por completo, mientras que los que están ubicados en el núcleo de la matriz permanecen atrapados. Esto produce un pH ácido en el núcleo que, a su vez, da como resultado una degradación acelerada(12).

1.7 Células troncales mesenquimales

Las células troncales mesenquimales (CTM), se definen como células multipotentes no hematopoyéticas con la capacidad de diferenciarse en linaje mesodérmico (adipocitos, osteocitos y condrocitos), linaje ectodérmico (neurocitos) y linaje endodérmico (hepatocitos). Hay varias fuentes de aislamiento de CTM, como tejido adiposo, médula ósea, sangre periférica y tejidos neonatales (cordón umbilical, placenta, líquido y membrana amniótica). La fuente de aislamiento de las CTM afecta en gran medida el rendimiento, la variedad expresada de marcadores de superficie y el perfil de citocinas. Sin embargo, los marcadores de identificación básicos de las MSC son CD73 (grupo de diferenciación 73), CD105, CD90, pero deberían ser CD34-, CD14-, CD45-, CD11b, CD19- y carecer de MHCII (complejo de antígeno leucocitario humano 2). Además de eso, las MSC deben expresar

factores de transcripción como el factor 4 de transcripción de unión a octámero (OCT-4) y la proteína homeobox NANOG(54).

Dentro de las características de CTM se encuentran la inmunomodulación, la hematopoyesis y la reparación de tejidos. Por otro lado, actualmente son ampliamente utilizadas en terapia celular, ingeniería de tejidos y medicina regenerativa por sus propiedades de autorrenovación, pluripotencia e inmunomoduladoras(55).

Uno de los factores, que afectan las características antes mencionadas es el microambiente de las células (se refiere a la matriz intercelular, otras células, interacción de las células, citoquinas y componentes humorales). La estabilidad del microambiente es fundamental para mantener la proliferación celular, la diferenciación, el metabolismo y las actividades funcionales de las células. El microambiente afecta la inmunomodulación, una de las características principales de CTM. Uno de los principales protagonistas es la interacción de las células CTM con los macrófagos. Existen estudios que comprueban que las células CTM liberan factores solubles como prostaglandina E2 (PGE2), factor de crecimiento transformador-beta (TGF- β) y ligando de quimioquinas con motivo (CCL2) lo que causa una transformación de los macrófagos con fenotipo M1 (proinflamatorio) a macrófagos M2 (antiinflamatorio). Por otro lado, las células CTM inhiben la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de los neutrófilos, disminuyendo su función inflamatoria. Además, se sabe que las MSC mantienen a los macrófagos y las células dendríticas en un estado inmaduro o antiinflamatorio, lo que previene la activación de las células T efectoras y promueve la formación de células T reguladoras (Treg). Se ha comprobado que las MSC también pueden secretar moléculas de inmunomodulación, como TGF- β 1, factor inhibidor de la leucemia e indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO). Cuando las células T colaboradoras CD4⁺ y los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos producen interferón- γ (IFN- γ), las células MSC de la médula ósea obtienen propiedades inhibitorias de las células T(55).

Con respecto a las células B, las células troncales mesenquimales pueden inhibir la formación de células plasmáticas y promover la producción de células B reguladoras (células Breg). Se ha demostrado que las células Breg, que producen IL-10 transforman las células T CD4⁺ efectoras en Foxp3⁺ Treg. En presencia de células T, las MSC aún pueden inhibir la proliferación de células B(55).

Otro aspecto importante dentro de sus características, se encuentra la reparación y regeneración de tejidos, donde se ha reportado que las CTM pueden secretar una variedad

de factores que respaldan la supervivencia celular, incluidos factores de crecimiento, citoquinas y matriz extracelular. Las CTM derivadas de tejido adiposo pueden actuar sobre las células endoteliales vasculares, promover la angiogénesis, siendo la formación de vasos sanguíneos fundamental en la regeneración de tejidos. Existen estudios que comprueban la interacción de las células CTM con el microambiente hepático. Las CTM afectan el microambiente hepático, a través de un efecto paracrino, modulando las respuestas inmunitarias y dirigiéndose al sitio de la lesión, lo que crea directa o indirectamente un microambiente regenerativo y repara los tejidos lesionados. Las CTM pueden regular la proliferación de células estrelladas hepáticas y la modulación de la matriz extracelular (ECM), induciendo la apoptosis de las células estrelladas hepáticas mediante la secreción de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), interleucina 10 (IL-10) y TNF- α (55).

Por otro lado, las MSC mantienen su capacidad de autorrenovación a través de la señalización de PGE2. PGE2 pertenece a la familia de las prostaglandinas, desempeñan un papel en la mediación de lípidos y otros efectos fisiológicos. Durante la síntesis de PGE2, hay una conversión de ácido araquidónico en prostaglandina H2 (PGH2) la cual está regulada por COX-2, una prostaglandina-endoperoxidasa sintasa. COX-2 es una enzima que cumple con la función de limitar la velocidad para regular las citocinas inflamatorias, los factores de crecimiento y los promotores de tumores. Las CTM secretan PGE2 al entorno extracelular por medio de la proteína 4 resistente a múltiples fármacos (MRP4), uniéndose a los receptores de PGE2 en las células diana. El receptor 2 de PGE2 (EP2) aumenta la proliferación celular y la neovascularización al promover la secreción de factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)(54).

Por todas las características mencionadas con anterioridad, las MSC se han convertido en un tema de constante investigación debido a su relevancia en tratamientos clínicos. Recientemente, ha surgido un nuevo paradigma terapéutico que utiliza exosomas derivados de CTM. Los exosomas (vesículas extracelulares) son ricos en lípidos, proteínas, ARNm, ARNt, ARN largos no codificantes, microARN y ADN mitocondrial, que se transfieren en forma paracrina o endocrina. Diferentes estudios han demostrado que los exosomas derivados de MSC ejercen efectos útiles en diferentes modelos de enfermedades, como el infarto de miocardio, la fibrosis hepática y el cáncer(56)(57,58). Sin embargo, a pesar de la evidencia científica de sus usos en tratamientos clínicos, su potencial de acción inmunosupresor e inmunomodulador de las CTM las ha convertido en un arma de doble filo, que puede actuar tanto a favor como en contra de la terapéutica. En 2018, *Wang et al.* (59)

mostró que las CTM modificadas con el gen IL-35 exhibieron mejores efectos protectores contra la hepatitis autoinmune inducida por concanavalina A (Con A). Por otro lado, *Fregni et al.* (60) mencionaron que el microambiente tumoral de las MSC provocó que algunos de los genes seleccionados se sobreexpresaron y promovieron la metástasis en el caso del cáncer de pulmón. Por lo tanto, el uso de las CTM debe ser estrictamente regulado y estudiado, ya que como lo demuestran una serie de investigaciones su propiedad moduladora del microambiente inmunitario puede ser contraproducente; un ejemplo reciente fue el estudio de las CTM que residen en el microambiente tumoral, donde desarrollaron resistencia a la terapia en las células tumorales(54).

1.7.1 Células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental (DPSC)

Las células troncales mesenquimales derivadas de tejidos orofaciales, han sido ampliamente utilizadas en el área de la medicina regenerativa, debido a la diversidad en la fuentes de obtención, capacidad regenerativa y fácil acceso. Estas células troncales en el sistema orofacial no se identificaron hasta principios de los años 2000, cuando se encontraron por primera vez en la pulpa dental(14). Sin embargo, hay diferentes células troncales derivadas de tejidos dentales, como las células troncales del ligamento periodontal (PDLSC), células troncales de dientes deciduos exfoliados humanos (SHED), las células precursoras del folículo dental (DFPC), las células troncales de la papila apical (SCAP), células troncales derivadas del hueso alveolar (ABMSCs), la vaina de la raíz epitelial de Hertwig (HERS) y las células troncales derivadas de la pulpa dental (DPSC). Estas últimas fueron las primeras en aislarse y ser caracterizadas(61). Las DPSC poseen características típicas como células troncales mesenquimales (MSC), demostrando adherencia plástica y propiedades clonogénicas con capacidades de diferenciación multilínea *in vitro*. Según *Gronthos et al.* (14) quienes fueron los primeros en caracterizar las células DPSC, reportó un inmunofenotipo similar al de BMSCs, junto con la formación de un nódulo calcificado con medio de diferenciación *in vitro*. Este grupo trasplantó DPSC en la superficie dorsal de ratones inmunocomprometidos con hidroxiapatita/fosfato tricálcico (HA/TCP), y los resultados mostraron que las DPSC pudieron regenerar un complejo similar a dentina/pulpa(14).

Se han identificado varios marcadores de superficie, que coinciden con los de las células MSC como CD146, CD105, CD90, CD73, CD59, CD44, CD29, CD13 y STRO-1. Sin embargo, no expresan antígenos de superficie como CD45, CD34, CD24, CD19 y CD14,

que son marcadores de células troncales hematopoyéticas. Las DPSC tiene la capacidad de diferenciarse en un linaje odontogénico, miogénico, adipogénico, osteogénico y neurogénico(62). Además, se han identificado subpoblaciones de células DPSC donde el 30 % de estas células expresan el receptor 2 del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (flk-1/VEGF-R2) y las DPSC flk-1+ podrían contribuir a la regeneración de los tejidos pulpaes vascularizados a través de la diferenciación sinérgica en osteoblastos y células endoteliales. Las DPSC que expresan ciertos biomarcadores, como STRO-1, CD271, CD90, α SMA y proteína de muerte celular programada-1 (PD-1), muestran una viabilidad más prolongada y una mejor multipotencialidad(61).

Además de la capacidad de diferenciación de las DPSC, tienen características inmunomoduladoras, como las que presentan las células MSC. Por otra parte, su inmunogenicidad es baja debido a que las células DPSC no presentan el antígeno del complejo de histocompatibilidad de clase II. Existe evidencia que las células DPSC liberan citocinas anti-inflamatorias como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), expresan el antígeno leucocitario humano G (HLA-G), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la prostaglandina E2 (PGE2) y la interleucina-6 (IL-6). Además, de liberar indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y óxido nítrico (ON) son moléculas indispensables en la respuesta inmunológica. Finalmente, las DPSC pueden lograr aumentar el número de células T reguladoras(62).

Algunas aplicaciones clínicas de las células DPSC a largo plazo, incluye inyecciones de células, células modificadas genéticamente, hojas de células y esferoides de células.

En el caso del trasplante de DPSC en forma de inyecciones, se ha estudiado como una terapia potencial para una variedad de lesiones y enfermedades, que incluyen, entre otros, accidente cerebrovascular, lesión de la médula espinal, ataxia cerebelosa, degeneración retiniana, neuropatía diabética, lesión de la glándula parótida, cistitis y síndrome de Sjögren. Las inyecciones utilizan como vehículo para la resuspensión de células troncales en una solución salina tamponada con fosfato(63).

Las DPSC inyectadas se distribuyen diferente de acuerdo con su administración; ejemplo, por vía intravenosa, las células DPSC se distribuyen principalmente en los pulmones y también pueden transferirse al área lesionada. Por otro lado, mientras que las DPSC inyectadas por vía intramuscular pueden entrar en los vasos sanguíneos y hacer metástasis, distribuyéndose principalmente en los músculos locales y persisten más tiempo

in vivo. Independientemente del tipo de inyección, las DPSC han mostrado efectos terapéuticos importantes(63).

Las DPSC modificadas genéticamente, han adquirido un importante potencial terapéutico; sin embargo, todavía hay varios factores a considerar antes de que las células DPSC modificadas genéticamente puedan usarse directamente en la medicina regenerativa. Las células modificadas genéticamente son aquellas que van a sobreexpresar genes terapéuticos o específicos de tejido; por lo tanto, proteínas específicas en los sitios de regeneración o promover la diferenciación de cierto linaje celular. La obtención de las células portadoras, la modificación genética y la expansión de las células *in vitro* y posteriormente el uso de las células como tratamientos de enfermedades *in vivo* es un método común para aplicar la terapia celular modificada genéticamente. Las DPSC, son células idóneas para estas modificaciones debido a sus características como la autorrenovación, el potencial de diferenciación multipotente y la amplificación *in vitro*, además de fácil acceso, bajo riesgo de rechazo inmunológico y menos problemas éticos(63).

Otro uso de las células DPSC en la ingeniería de tejidos, es trasplantarlas en forma de lámina celular. Esta tecnología permite recolectar células como una lámina continua con proteínas de matriz extracelular (MEC) intactas y uniones célula-célula, sin ningún otro biomaterial o andamio. Una de sus principales ventajas es que la lámina celular se adhiere con mayor facilidad al sitio trasplantado sin considerar los efectos negativos de la degradación del material (63). Existen diferentes técnicas para formar las láminas celulares, una de ellas es a través de placas de cultivo sensibles a la temperatura, donde los cambios de temperatura provocan que las láminas se desprendan fácilmente. Otra de las técnicas que se han reportado es el uso de la vitamina C, que cumple con la función de la biosíntesis de la proteína colágena y otros componentes de la MEC. Esta función de la vitamina C facilita la formación de varias capas celulares (5-6 capas) y por lo tanto de su trasplante al sitio lesionado. Las DPSC en forma de láminas se han usado para el tratamiento regenerativo de lesiones de pulpa dental(64), tejido periodontal(65), defectos óseos (66) y lesiones nerviosas(67)

Además de los usos anteriormente reportados para la medicina regenerativa, las células DPSC se han cultivado en forma de esferoides debido a que se considera la conformación más cercana al microambiente *in vivo*, ya que es una agregación de células en 3D, que asemeja el proceso de autoensamblaje biológico y contactos intensivos célula-célula, que

se lleva a cabo durante el desarrollo embrionario, con el objetivo de formar tejidos complejos con arquitectura 3D(63). Se ha demostrado que las células DPSC cultivadas en 3D aumenta su nivel de expresión de los marcadores de troncalidad como Oct4, Sox2, NANOG, TP63 y CD44 en comparación con el cultivo 2D. Además, de su potencial de diferenciación osteogénico, adipogénico, odontogénico y neurogénica. Las investigaciones actuales, han confirmado la mejora de las propiedades DPSC en esferoides 3D; sin embargo, se necesita mayor investigación para explorar las ventajas terapéuticas(68).

1.7.2 DPSC y regeneración ósea

Las células más utilizadas en la ingeniería de tejidos óseos son las células troncales mesenquimales derivadas de la médula ósea (BMSC) por su alta capacidad osteogénica, porque estimulan el entorno óseo reclutando células troncales y osteoblastos adyacentes(69), como resultado se considera una de las poblaciones celulares más apropiadas para la regeneración ósea; además, se ha demostrado que las BMSC sembradas en andamios e implantadas en modelos óseos *in vivo* son más eficaces en promover la formación de hueso que los andamios solos(70). Sin embargo, debido a la morbilidad del sitio donante, el limitado número de células en el momento de recolección y la pérdida del fenotipo celular durante el cultivo, se han considerado otras células(69). Las células DPSC son una fuente celular alterna a las células BMSC, debido a sus características como su alta tasa de proliferación, potencial de diferenciación osteogénica, propiedades paracrinas e inmunomoduladoras favorables, facilidad de aislamiento, y disponibilidad. Existe amplia evidencia científica que ha confirmado la capacidad de las células DPSC para diferenciarse a linaje óseo y promover la regeneración ósea, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*(70). Por otro lado, se han comparado y evaluado las dos líneas celulares BMSC y DPSC con resultados contradictorios. Por una parte, se ha demostrado que las células DPSC expresan marcadores relacionados con el tejido óseo similares a las BMSC y parecen ser capaces de producir más unidades formadoras de colonias, tasa de proliferación más alta y además sobreviven durante más tiempo que las BMSC(69). Además, al diferenciarse al linaje óseo, secretan matriz extracelular mineralizada, así como una estructura trabecular similar al hueso. Sin embargo, existen estudios comparativos del potencial osteogénico de BMSC y DPSC tanto *in vitro* como *in vivo* que son contradictorios. *Lee et al.* (70) mencionan que esta contradicción se debe a que la mayoría de los estudios son análisis *in vitro*, o se comparan las capacidades de regeneración ósea en modelos de animales pequeños, además de esto los efectos osteogénicos que tendrán

las células va a cambiar dependiendo del sitio anatómico donde serán implantadas. Como resultado, todavía no está claro qué tipo de célula (BMSC o DMSC) debería recomendarse para la aplicación clínica; no obstante, *Fujii et al.* (71) indican que las DPSC pueden ser adecuadas para los tratamientos en la regeneración ósea en la región oral y cráneo maxilofacial debido a su origen embrionario, ya que los hueso craneofaciales se originan en la cresta neural, y se ha comprobado que existen diferencias osteogénicas en comparación con el mesodermo que da origen a los hueso largos, es decir, las células derivadas de la cresta neural, muestran una regeneración más eficiente del tejido óseo que sus homólogos derivados del mesodermo.

2. Diseño experimental

Pregunta de Investigación

¿Es posible, que un andamio de PLA impreso en 3D, con una superficie de porosidad graduada con tres tipos de poros diferentes y degradación *in vitro* previo a la implantación, mejore el proceso de regeneración ósea en defectos óseos de tamaño crítico en calvarias de ratas *Wistar*?

Planteamiento del problema y justificación

En el área de ingeniería de tejidos óseos existen pocos casos clínicos, donde se implemente el uso de imágenes médicas para el diseño del andamio y posterior impresión para la regeneración ósea, esto se debe principalmente a que el hueso es un tejido complejo, difícil de imitar y de regenerar, por tal motivo, se necesita mejorar las características de los andamios física y químicamente para el uso clínico. Por lo tanto, el estudio y optimización de los andamios sigue siendo necesaria en investigación básica.

Considerando esto, se propone en este trabajo de investigación imprimir andamios 3D con porosidad graduada y tres tipos de poros diferentes, debido a que está reportado que los andamios con tamaños de poros diferentes presentan mejores resultados en la regeneración ósea, específicamente en la zona del centro del defecto, la cual se considera una zona crítica de regeneración, debido a la localización anatómicamente lejana del sitio donde se encuentran las células huésped, nutrientes, factores de crecimiento que promueven la angiogénesis y por lo tanto la regeneración ósea. En este proyecto, el andamio se diseñó con tamaños de poros de mayor diámetro en el centro, para permitir que los vasos sanguíneos que se formen atravesen los poros y nutran a todo el andamio, mientras que los poros con un diámetro más pequeño se diseñaron en los bordes del mismo, permitiendo la adhesión y proliferación de las células a través de estos.

Por otro lado, la geometría o tipo de poro también adquiere un papel crucial en la respuesta celular y angiogénesis, el tipo de poro ciego y cerrado funcionan como señales topológicas para las células, mientras que los poros abiertos permitieron la formación de vasos sanguíneos y direccionaron el tejido *novo*. Además, con el objetivo de mejorar la respuesta de regeneración ósea, estos andamios fueron sembrados con células troncales

mesenquimales derivadas de pulpa dental (DPSC), debido a su reconocido potencial regenerativo. Al mismo tiempo, se llevó a cabo un proceso de degradación *in vitro* del material previo a la implantación del constructo en modelos óseos *in vivo*, debido a que está reportado que, el tiempo de degradación del PLA se encuentra entre los 12-24 meses siendo un factor importante que puede limitar la formación de tejido *novo* óseo, el cual empieza a mineralizarse a partir de los 3 meses. Por tal motivo, los andamios impresos en 3D con las características descritas con anterioridad, formaron tejido mineralizado en los defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas *Wistar* de manera eficaz, con la calidad y cantidad de tejido de *novo* similar al hueso nativo.

Hipótesis

El diseño de constructos impresos en 3D con una superficie con porosidad graduada, con tres tipos de poros diferentes y degradación *in vitro*, modulará la respuesta de adhesión y proliferación de células DPSC inducidas a linaje óseo, para la regeneración en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas *Wistar*.

Objetivo General

Evaluar la regeneración en defectos de tamaño crítico en calvaria de rata *Wistar*, por medio de andamios en 3D con porosidad graduada, con tres tipos de poros diferentes, y degradación *in vitro*.

Objetivos Específicos

- 1.- Imprimir andamios con porosidad graduada con tres tipos de poros diferentes, por medio de la técnica de modelado por deposición fundida.
- 2.-Analizar la superficie de los andamios, midiendo el tamaño de poro y porosidad, usando imágenes de microscopio electrónico de barrido (MEB).
- 3.-Evaluar la estructura superficial de los constructos, de las cuales serán sometidas a un proceso de degradación *in vitro* a diferentes tiempos (0, 60, 100, 140 y 180 días).
- 4.- Identificar el tiempo de degradación del PLA que favorezca la colonización y proliferación de las células DPSC inducidas a linaje óseo.

5.-Estimar la densidad mineral ósea del tejido *novo* en el modelo de regeneración ósea *in vivo* a partir de imágenes de μ CT.

3. Metodología

Diseño de los andamios de PLA

Previo al diseño del andamio, se obtuvo una imagen en formato DICOM de un defecto óseo en una calvaria de rata *Wistar*, adquirida en el microtomógrafo Albira ARS, Oncovisión, en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan). A partir, de esta imagen se utilizó el software Invesalius© para transformar de formato DICOM a STL, posteriormente para el diseño de los tres prototipos de andamios, se utilizaron los siguientes programas; 3D Builder©, Autodesk Mesmixer© y Rhino©. Finalmente, para poder transformar la imagen 3D a un objeto, se utilizó el software Ultimaker Cura© que transforma el formato STL a un formato G-code que puede leer la impresora 3D, además de permitir la modificación de parámetros de impresión.

Impresión de los andamios

La impresora 3D que se empleó (Monoprice Select - Mini impresora 3D) se fundamenta en la técnica de modelado por deposición fundida (FDM) con extrusión capa por capa, la punta de extrusión tiene un diámetro de 200 micras, elevando la temperatura a 205°C para fundir el filamento del ácido poliláctico (PLA) de color blanco, con 1.75 mm de diámetro, que va solidificando el filamento fluido conforme entra en contacto con el ambiente; por otro lado, la cama de impresión fue calibrada de manera manual. Para la estandarización de parámetros de impresión se utilizó el software Ultimaker Cura©. Imprimiendo un total de 250 muestras.

Evaluación de la superficie del andamio (tamaño de poro)

Se adquirieron imágenes de 5 muestras en un equipo de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) JEOL 5600LV con un voltaje de operación de 25kV, con un aumento de 25x, utilizando electrones secundarios y retro-dispersados; las muestras fueron preparadas previo a su observación con un recubrimiento de película de oro mediante la pulverización catódica asistida por plasma para favorecer la conductividad. El equipo se encuentra en el

Laboratorio Central de Microscopía del IFUNAM. Se midieron 130 tamaños de poros, utilizando el software *ImageJ*.

Porosidad del andamio y degradación *in vitro* del constructo de PLA

La porosidad se obtuvo utilizando el principio de Arquímedes, en 100ml de agua desionizada, la porosidad fue calculada de acuerdo con la siguiente fórmula(72). Se midió la porosidad por triplicado.

$$\text{Porosity} = (W_{\text{sat}} - W_{\text{dry}})/(W_{\text{sat}} - W_{\text{sus}}) \times 100 \%$$

W_{sat} = andamio saturado de agua.

W_{dry} = andamio seco.

W_{sus} = andamio suspendido en agua.

W = peso.

El experimento de degradación *in vitro* para muestras de PLA se realizó colocando los andamios individualmente en frascos ámbar con 134 ml de solución Ringer Hartmann para calcular el volumen de solución se obtuvo de *Felfel et al. (73)*, cada 100 ml contiene: cloruro de sodio (0.600 g), cloruro de potasio (0.030 g), cloruro de calcio dihidratado (0.020 g) y lactato de sodio (0.310 g) durante (0, 60, 100, 140 y 180 días), colocados en una estufa (FELISA) a 37 °C.

Medición de potencial de hidrógeno (pH) y peso

Como parte de la evaluación de los cambios, provocados por el proceso de degradación, se midió el pH de la solución Ringer Hartmann de cada grupo de andamios de acuerdo con el tiempo de degradación (0, 60, 100, 140 y 180 días) con el potenciómetro (PEAK INSTRUMENTS) previamente calibrado. Por otro lado, se dejaron secar los andamios durante 30 min en la estufa FELISA a 37 °C y posteriormente se pesaron en la balanza analítica (aeADAM).

Pruebas mecánicas

Se realizaron ensayos de compresión uniaxial, usando una Máquina de Pruebas Mecánicas Universal (INSTRON 5567) a una velocidad de 1 mm/min, se usó una celda de carga de 4.5 kN, a una temperatura de 23 °C y humedad de 50 %. Se calculó el módulo elástico y el esfuerzo máximo. Las pruebas mecánicas se realizaron a 25 andamios categorizados de acuerdo con su tiempo de degradación (0,60,100,140 y 180 días), es decir 5 andamios en cada grupo.

Cultivo celular

Se cultivaron y expandieron células troncales mesenquimales derivadas de pulpa dental (DPSC) previamente caracterizadas en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS(74), se usó medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's médium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos, (penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100 µg/ml) y fungisona (0.3 µg/ml)). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37 °C y en una atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO² en un ambiente con 100 % de humedad. Los andamios previamente fueron esterilizados con gas de óxido de etileno. Las células fueron sembradas a una densidad de 2x10⁴ células/ml sobre los andamios impresos en 3D, con los diferentes tiempos de degradación (0, 60, 100, 140 y 180 días) por triplicado cada uno de los grupos, en un plato de 46 pozos. Se realizó cambio de medio de cultivo al tercer día a medio osteogénico (50 µm de ácido ascórbico, 10 mM de β- glicerofosfato y 10⁻⁷ M de dexametasona) como inductor a la diferenciación. Posteriormente se realizaron los ensayos de viabilidad celular, fosfatasa alcalina y alizarina roja.

Ensayo de viabilidad celular (WST-1)

Para evaluar la viabilidad de las células DPSC en los andamios impresos en 3D, se utilizó el ensayo WST-1, el cual se fundamenta en la transformación de la sal de tretazolio WST-1 (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) a formazán por medio de la enzima mitocondrial deshidrogenasa, la actividad de la enzima incrementa la cantidad del colorante de formazán, lo que corresponde directamente con la actividad metabólica de las células. A cada andamio con células DPSC clasificados de acuerdo con

su tiempo de degradación (0, 60, 100, 140 y 180 días), se les añadió 20 µl del reactivo WST-1 por 200 µl de medio de cultivo, se mantuvo incubando por 4 h. Posteriormente, la solución fue transferida a una placa de 96 pozos para realizar la lectura, a una longitud de onda de 450nm en un lector de ELISA (Chromate, Awareness), el ensayo se realizó a los 1, 7 y 14 días.

Ensayo de fosfatasa alcalina (ALP)

Para evaluar la actividad ALP en los andamios con células DPSC en medio osteogénico, clasificados de acuerdo con su tiempo de degradación (0, 60, 100, 140 y 180 días), se usó el kit de ensayo colorimétrico ALP (Abcam, Cambridge, Reino Unido) que se basa en la desfosforilación de pNPP por la enzima ALP que genera un color amarillo. Posteriormente, los andamios 3D fueron lavados con PBS, después fueron transferidos a tubos eppendorf de 1.5 mL para ser lisados con una solución de 0.1% de tritón X-100 (ALP assay buffer) durante 30 min, posteriormente de la solución lisada donde se encontraban sumergidos los andamios 3D clasificados de acuerdo con su tiempo de degradación, se tomaron 25 µl por triplicado, y se colocaron en los pozos de la placa de 96, después se le adiciono 50 µl de la solución de p-nitrofenil fosfato pNPP (5 mM) a cada pozo se dejó incubando por 30 minutos y se agregó 20 µl de solución stop (NaOH), finalmente se llevó la placa al lector de ELISA (Chromate Awareness) y se midió a una longitud de onda a 405 nm. La actividad de ALP se calculó como el pNPP generado por las muestras durante la incubación por unidad de volumen de muestra por minuto de reacción. El ensayo se realizó a los 7 y 14 días.

Ensayo de Alizarina Roja (ARS)

El ensayo de Alizarina Roja (ARS), se usó para la detección visual de los depósitos de calcio formados por las células DPSC en un medio osteogénico, sobre los andamios 3D clasificados por su tiempo de degradación, usando el kit de tinción de alizarina roja (ARS) con una solución de 40 mM pH 4.2 (Osteogenesis kit, Millipore). Los andamios 3D fueron lavados cuidadosamente con PBS y fijados con 4 % de paraformaldehído por 24h, después fueron lavados tres veces gentilmente con agua destilada. Posteriormente, los andamios fueron teñidos con alizarina roja por 30 minutos, pasando el tiempo de incubación fue retirada la solución de ARS y se realizaron varios lavados con agua destilada, al eliminar el exceso de colorante se tomaron imágenes con el uso de un microscopio estereoscópico (Olympus DSX-HRSU, Tokio, Japón). Para cuantificar la ARS, los andamios se colocaron

en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se les adicionaron 200 μ L de ácido acético al 10 % por 30 minutos en agitación, a continuación los tubos fueron incubados a 85 °C por 10 minutos, posteriormente pasados a hielo por 5 minutos y centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, se agregaron 75 μ l de hidróxido de amonio al 10 % para detener la reacción. Se tomaron 200 μ L de la solución, para leerla en una placa de lectura a una longitud de 405 nm. El ensayo se realizó el día 7 y 14.

Procedimiento quirúrgico general en ratas *Wistar*

Se utilizaron 20 ratas macho cepa *Wistar* de 18 semanas con 250 g de peso, las cuales se asignaron aleatoriamente en 4 grupos de 5 ratas cada uno; 1) control (andamio con porosidad graduada), 2) andamio con células DPSC inducidas a linaje óseo 3) andamio impreso con proceso de degradación *in vitro* y DPSC inducidas a linaje óseo 4) andamio impreso con proceso de degradación *in vitro* sin células. Los procedimientos quirúrgicos siguieron los procedimientos establecidos por el Comité Interno de Cuidados y Usos de Animales de Laboratorio (CICUAL) aprobado con número FO-M001-0009-2021 y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO1999.

Los diferentes grupos de especímenes se tranquilizaron vía intramuscular con Ketamina (80 mg/kg) y sedaron con Isoflurano por vía inhalada por medio de sistema de anestesia SomnoSuite. La zona quirúrgica se rasuro y se realizó antisepsia de rutina con yodopovidona, se aplicó de manera tópica mepivacaína con epinefrina, a continuación, se realizó una incisión lineal de 3 cm a través de la piel y el periostio de la calota hasta exponer el vértice craneal. Para realizar el defecto crítico se utilizó una trefina con diámetro de 9 mm, montado en un motor para implantes a 4,000 rpm, se delimitó el defecto de tamaño estandarizado en la porción media del hueso frontal, irrigando con una solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS). Posteriormente con un cincel se realizó el clivaje del fragmento óseo con sumo cuidado de no dañar la duramadre, lavando con PBS estéril la zona quirúrgica.

Los andamios impresos 3D de PLA se colocaron en el sitio del defecto, de acuerdo con la clasificación anteriormente descrita. Finalmente, se afrontó el tejido suturando de manera continua con ácido poliglicólico 4-0. Posteriormente se realizó un seguimiento clínico postquirúrgico, valorando una serie de parámetros: estado general del animal, aspecto de la herida, sangrado, exudado o colecciones o extrusión de los biomateriales. Las ratas

permanecieron en condiciones de fotoperiodo de 12 horas y una humedad relativa al 50 % y se alimentarán con rodent diet 5001 ad libitum.

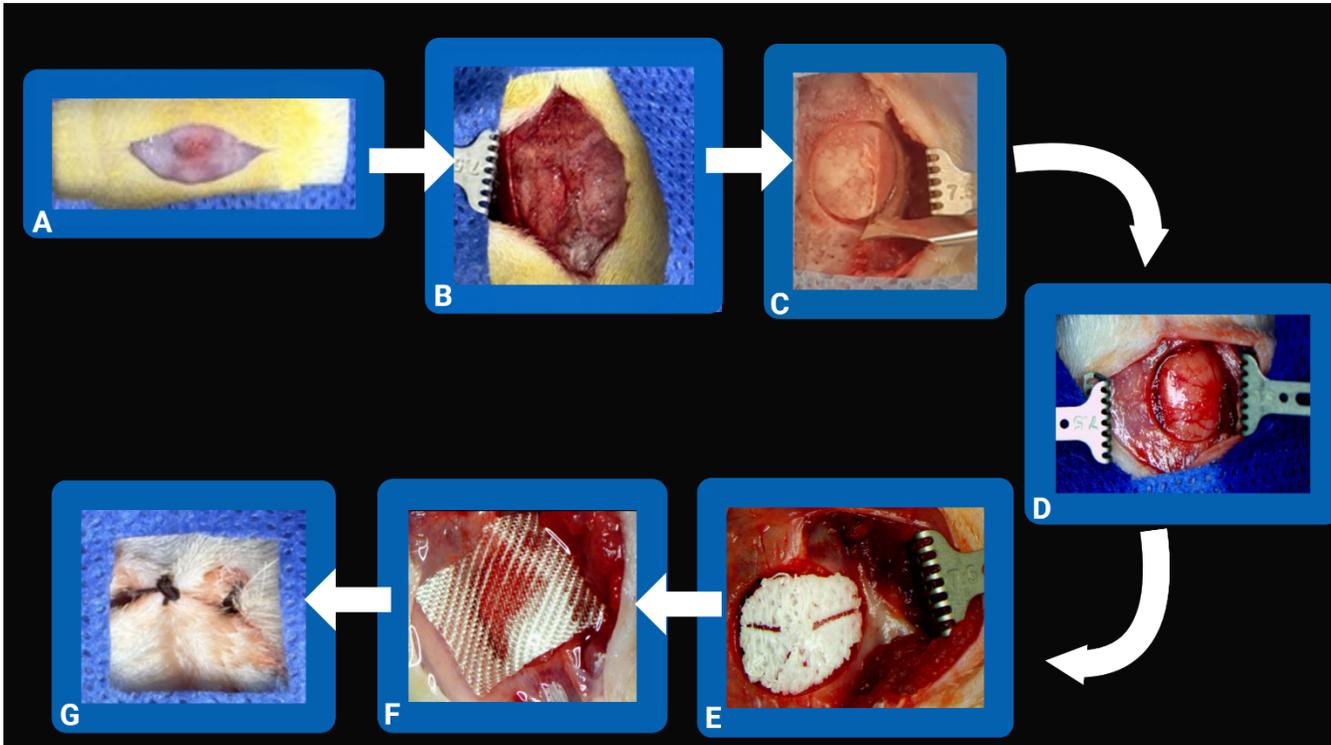


Figura 5. Procedimiento quirúrgico. A) Incisión de 3 cm de largo aproximadamente. B) Exposición de la calvaria de la rata C) Realización del defecto óseo con una trefina de 9mm de diámetro y clivaje de hueso. D) Exposición de la duramadre. E) Implantación del andamio en el defecto óseo. F) Colocación del satén hemostático sobre el implante. G) Reposición de los tejidos y sutura quirúrgica. Creada con BioRender.com

Evaluación de los constructos implantados por microtomografía computarizada (μ CT)

Para evaluar la densidad mineral ósea (DMO) del tejido *novo*, se adquirieron imágenes de μ CT de los animales a diferentes periodos de tiempo posterior a la implantación del constructo 3D de PLA a 30, 60 y 90 días. El campo de visión se ubicó en la zona de la calvaria con una magnitud de corriente de 0.4 miliamperes (mA), un voltaje de 35 kilovoltios (kV) y 1000 proyecciones para obtener imágenes de alta resolución.

Para calcular la DMO, se realizó en las imágenes microtomográficas, cubos de 3 mm por lado en la zona del defecto, así como en zonas de hueso nativo (control), lo anterior por

medio del software PMOD. Posteriormente se hicieron ajustes polinómicos con respecto a una concentración conocida de hidroxiapatita, con la finalidad de conocer los gramos de hidroxiapatita por centímetro cúbico (gHA/cc) tanto en los controles como en los experimentales. Las imágenes en 3D de las muestras fueron procesadas por medio del Software OsiriX MD, con las cuales se realizaron comparaciones cualitativas de cada uno de los grupos antes mencionados.

Eutanasia de los animales

Al final del periodo del tiempo establecido, se llevó a cabo la eutanasia animal, utilizando monóxido de carbono para evitar dolor y sufrimiento hasta llegar al paro cardio-respiratorio, de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO1999. Posteriormente, se realizaron osteotomía para la remoción de la calota en la zona del defecto, la cual fue con pieza de alta rotación e irrigación con agua corriente, con un margen de seguridad de 10 mm en toda la periferia del defecto, posteriormente se lavaron cuidadosamente la muestra y se colocaron en formol al 10 % durante 24 horas para su fijación.

Análisis Estadístico

Diseño

Para evaluar las diferencias en los tamaños de poros impresos en comparación con los diseñados, se realizó un análisis de U de Mann-Whitney con el programa estadístico IBM SPSS statistics. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con una p-valor menor a 0.05.

Resultados degradación *in vitro*

Para evaluar el porcentaje de porosidad, se realizó una prueba de ANOVA de una sola vía, con prueba post hoc Tukey. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con una p-valor menor a 0.05 (*). Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 9.4.1

Para evaluar el valor de pH se realizó una prueba de Kruskal Wallis con prueba post hoc de Dunn. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con una p valor <0.05 (*), p<0.01 (**) y p <0.001 (***). Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 9.4.1.

Para evaluar el peso de los andamios, se realizó una prueba de ANOVA de una sola vía con prueba post hoc de Tukey. Los resultados fueron estadísticamente significativos con un p valor <0.05 (*), p<0.01 (**), p <0.001 (***) y p <0.0001 (****). Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 9.4.1.

Para evaluar el Módulo de Young y el Esfuerzo Máximo entre los andamios, se realizó una prueba de ANOVA de una sola vía, con prueba post hoc Tukey. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con una p-valor menor a 0.05 (*). Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 9.4.1.

Resultado celular *in vitro*

Para el ensayo de WST-1, se realizó una prueba de ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey. Los resultados fueron estadísticamente significativos con un p valor <0.05 (*), p<0.01 (**), p <0.001 (***) y p <0.0001 (****). Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 9.4.1.

Para el ensayo de Fosfatasa Alcalina, se realizó una prueba de ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con una p valor <0.05 (*), p<0.01 (**), y p <0.001 (***). Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 9.4.1.

Para el ensayo de Alizarina Roja, se realizó una prueba de ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con una p valor <0.05 (*), p<0.01 (**), y p <0.001 (***). Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 9.4.1.

Resultados en modelo *in vivo*

Para evaluar la Densidad Mineral Ósea (DMO) de los grupos experimentales y grupo control, se realizó una prueba de ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Tukey. Los resultados fueron estadísticamente significativos con un p valor <0.05 (*), p<0.01 (**), p <0.001 (***) y p <0.0001 (****). Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 9.4.1.

Para evaluar la Densidad Mineral Ósea (DMO) del tejido *novo* a los 90 días, se realizó una prueba de ANOVA de una sola vía con prueba post hoc de Tukey. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos con una p valor <0.05 (*), p<0.01 (**), y p <0.001 (***). Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 9.4.1.

4. Resultados

Diseño del andamio con porosidad graduada, incluyendo los tres tipos de poro

Se realizó un defecto de tamaño crítico en la calvaria de una rata *Wistar* de acuerdo con la metodología descrita, esta imagen se obtuvo en formato DICOM (Digital Imaging and Communication On Medicine) y se transformó en formato STL (Standard Tessellation Language) para crear una superficie tridimensional que puede ser modificada posteriormente por otros softwares. En la figura 6 se observa superficie 3D en el software InVesalius©.

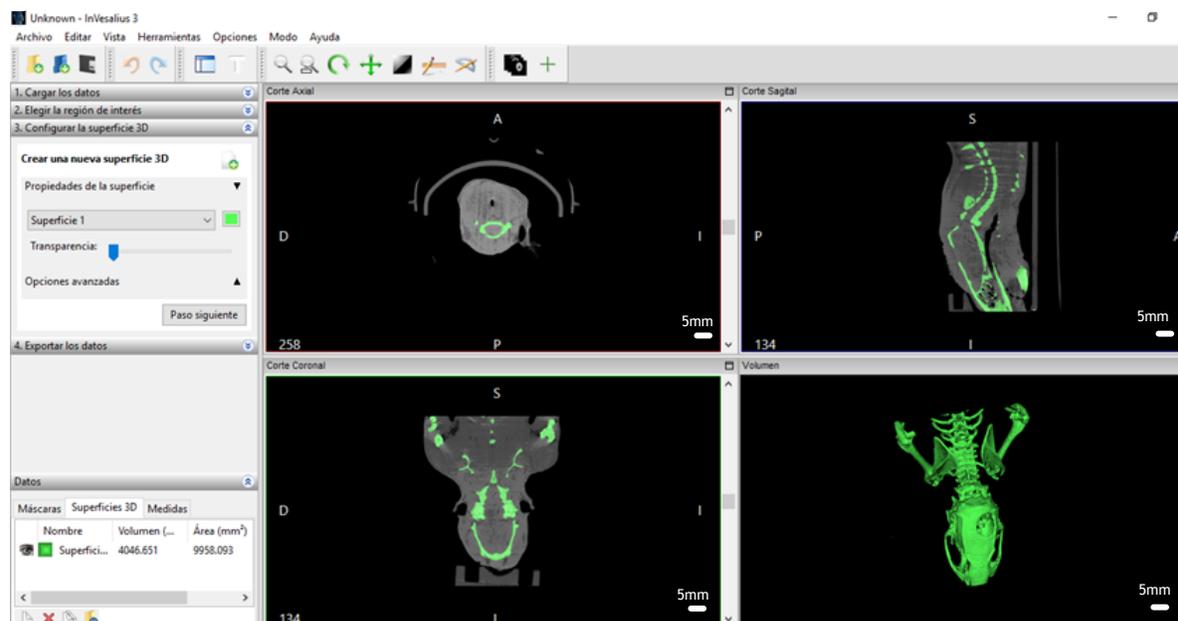


Figura 6. Imagen de defecto óseo en calvaria de rata *Wistar*, procesada para crear una superficie tridimensional en el software InVesalius©. Fuente propia

Una vez creada la superficie 3D se exportó la imagen al software Autodesk Meshmixer© y la imagen se perfeccionó en el software Rhino©, donde se diseñó tres prototipos de andamios, el primer prototipo incluyó una superficie con porosidad graduada y con poros cerrados, el segundo diseño porosidad graduada con poros cerrados y ciegos, finalmente el tercer prototipo incluye poros cerrados, ciegos y abiertos, como se muestra en la figura 7. Todos los diseños se adaptan al defecto óseo en tamaño y forma como se muestra en la figura 8, donde se observa como el andamio que incluye los tres tipos de poros, se ajusta al defecto

óseo desde una vista frontal figura 8A, interna figura 8B, lateral izquierda figura 8C y lateral derecha figura 8D.

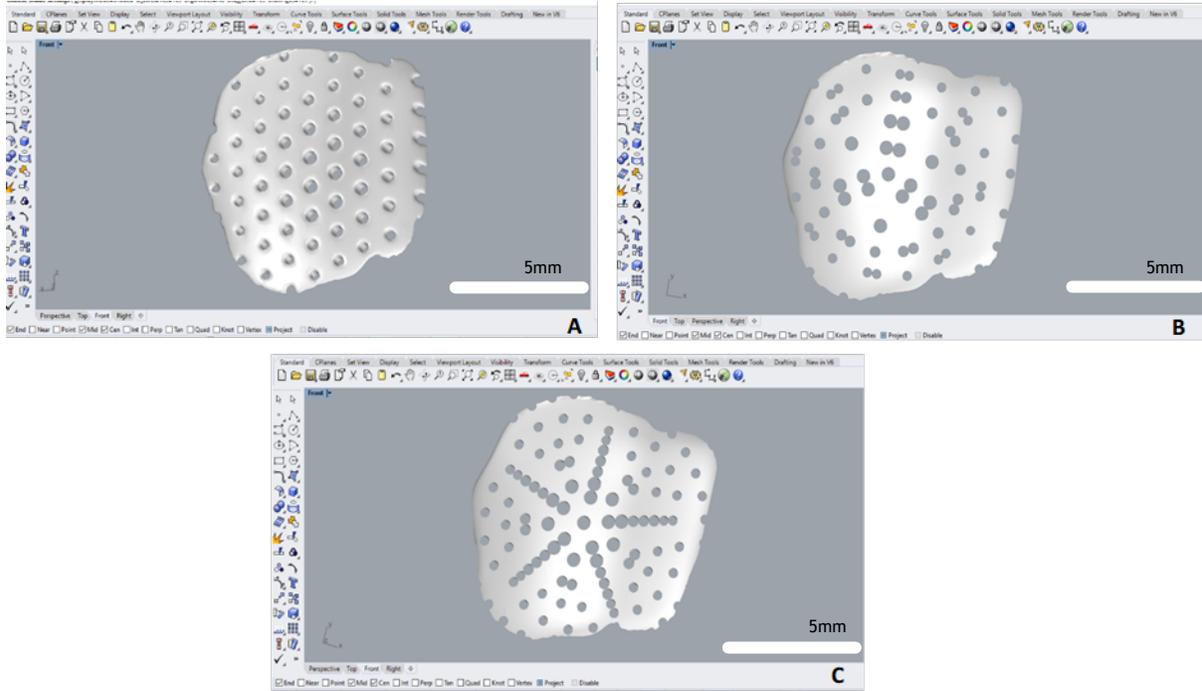


Figura 7. Diseño de los tres prototipos de andamios. A) Andamio con poros graduados de tipo cerrado. B) Andamio con poros graduados con poros cerrados y ciegos. C) Andamio con poros graduados con poro ciego, cerrado y abierto.

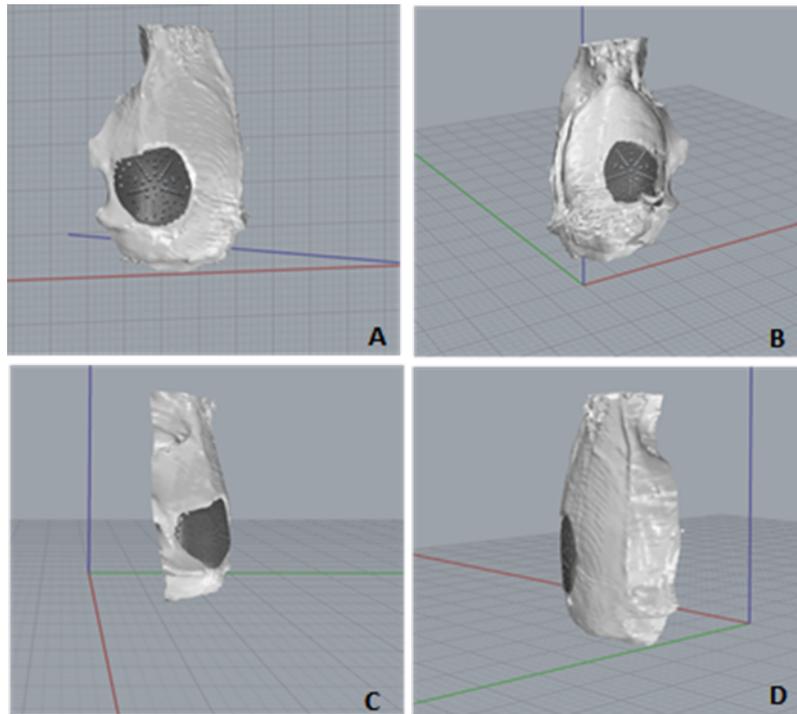


Figura 8. Andamio adaptado al defecto óseo. A) Andamio se adapta al defecto óseo desde una vista frontal. B) Vista interna. C) Vista lateral izquierda. D) Vista lateral derecha.

En la figura 9 se observa la porosidad graduada solo en el diseño que corresponde a la figura 7C y la medida de los tamaños de poro, utilizando el software Rhino©. En los bordes del andamio los tamaños de poro se diseñaron a 300 μm como se muestra en la figura 9A. En la figura 9B se diseñaron los poros que se encuentra más cercanos a la zona del centro de 450 μm , figura 9C se diseñaron los poros que se encuentran en el centro del andamio 500 μm . Figura 9D poro ciego o interconectado que se encuentra en la zona central del andamio diseñados a 700 μm . Figura 9E esquema que representa el concepto de porosidad graduada y como concuerda con los tamaños de poro registrados en las imágenes de diseño.

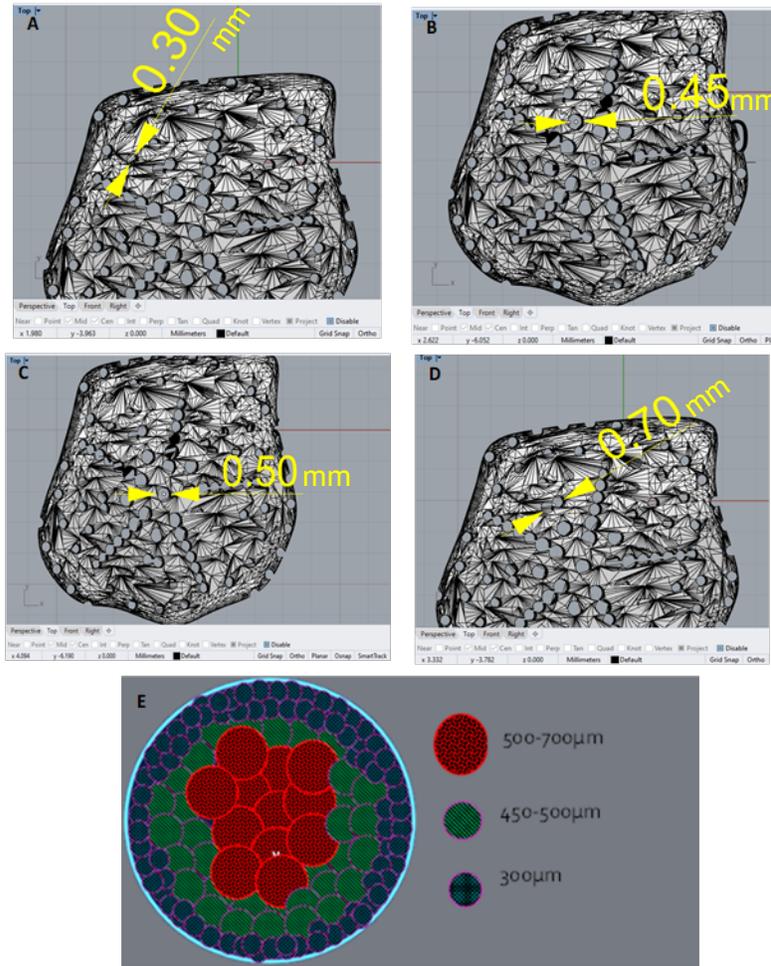


Figura 9. Tamaños de poro de acuerdo con el diseño. A) Los poros que se encuentran en los bordes del andamio tienen un tamaño de 300 μm . B) Poros que se encuentran más cercanos al centro de 450 μm C) Poros que se encuentran en el centro del andamio 500 μm . D) Poros ciego o interconectados que se encuentran en la zona central del andamio 700 μm . E) Esquema que representa el concepto de porosidad graduada.

Estandarización de los parámetros de impresión

Con el objetivo de imprimir los andamios con porosidad graduada y los tres tipos de poros, respetando la concavidad y convexidad del defecto óseo, se estandarizó más de 50 parámetros de impresión del software Ultimaker Cura®, como se muestra en la tabla 1, por otro lado, como parte de las modificaciones necesarias para obtener los andamios con las características descritas, se cambió continuamente la boquilla de extrusión de 200 micras debido a que deforma el diámetro del orificio de salida, por la alta presión que se ejerce sobre ella (figura 10), provocando cambios en la resolución del andamio.

Relleno		Desplazamiento		Adhesión del plato de construcción		Experimental	
Variable	Parámetro	Variable	Parámetro	Variable	Parámetro	Variable	Parámetro
Densidad de relleno	20 %	Modo de rastreo	No en piel	Tipo de adhesión al plato de construcción	Borde	Circunferencia mínima del polígono	0.2 mm
Distancia de la línea de relleno	2 mm	Evitar piezas impresas al imprimir	Si	Ancho del borde	5 mm	Resolución máxima	0.5 mm
Patrón de relleno	Zigzag	Evitar material de soporte al imprimir	n/a	Recuento de líneas de borde	15	Resolución máxima de desplazamiento	0.4 mm
Multiplicador de línea de relleno	1	Evitar distancia de desplazamiento	0.625 mm	Borde sólo fuera	Si		
Porcentaje de superposición de línea de relleno	10 %	Brinco Z al retraer	n/a				
Ancho de relleno por capa	0.18 mm						
Pasos graduales de relleno	0						
Pasos graduales de relleno	0						

Material		Velocidad		Calidad		Capa	
Variable	Parámetro	Variable	Parámetro	Variable	Parámetro	Variable	Parámetro
Temperatura de impresión	200 °C	Velocidad de impresión	10 mm/s	Altura de capa	0.18 mm	Grosor de pared	1.05 mm
Temperatura de impresión de capa inicial	205 °C	Velocidad de relleno	10 mm/s	Altura de capa inicial	0.18 mm	Recuento de líneas de pared	10
Temperatura de impresión inicial	190 °C	Velocidad de Pared	5 mm/s	Ancho de línea	0.2 mm	Grosor superior/inferior	0.72 mm
Temperatura de impresión final	185 °C	Velocidad de pared exterior	10 mm/s	Ancho de la pared de líneas	0.2 mm	Grosor superior	0.72 mm
Temperatura del plato de construcción	50 °C	Velocidad de pared interior	10 mm/s	Ancho de la pared exterior de líneas	0.2 mm	Capas superiores	0
Temperatura del plato de construcción de la primera capa	50 °C	Velocidad superior/inferior	6 mm/s	Ancho de las paredes interiores	0.2 mm	Grosor inferior	0.72 mm
Inhabilitar retracción	Si	Velocidad de desplazamiento	80 mm/s	Ancho superior/inferior	0.2 mm	Capas inferiores	2
Retraer al cambio de capa	Si	Velocidad de capa inicial	5 mm/s	Ancho de línea de relleno de capa	100 mm	Rellenar espacios entre paredes	En ningún lugar
Distancia de retracción	1.5 mm	Velocidad de borde	5 mm/s			Expansión Horizontal	-0.11 mm
Velocidad de retracción	40 mm/s	Inhabilitar control de aceleración	n/a				
		Inhabilitar control de arranque	n/a				

Tabla 1. Parámetros de impresión en Ultimaker Cura®, para andamios 3D con porosidad graduada y tres tipos de poros diferentes.



Figura 10. Boquillas de extrusión de 200 μm . A) Boquilla de extrusión después de imprimir más de 50 muestras. B) Boquilla de extrusión antes de imprimir.

Impresión de los andamios con porosidad graduada y tres tipos de poros

Una vez establecidos los parámetros de impresión, se decidió imprimir solamente el diseño de la figura 7C. El conjunto de las modificaciones descritas con anterioridad permitió la impresión del andamio de tamaño exacto al defecto óseo con porosidad graduada y tres tipos de poros, como se muestra en la figura 11A una vista frontal de la zona convexa del andamio donde se hace evidente la superficie porosa sin ser afectada al eliminar el material de soporte y adhesión, figura 11B vista frontal del andamio de la zona cóncava, figura 11C es una vista frontal del andamio donde se puede observar que su diámetro es de 9 mm y se hace evidente por la translucidez de la imagen que los poros atraviesan la superficie de un lado a otro, también se observa el material de adhesión y soporte, parámetros indispensables para su impresión.

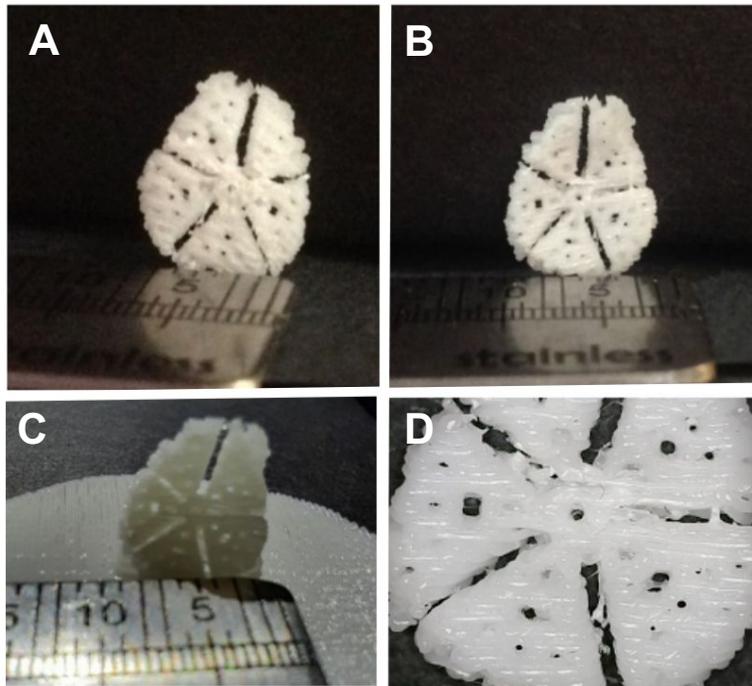


Figura 11. Andamio impreso en 3D. A) Vista frontal del andamio (convexo) B) Vista frontal (cóncavo) C) Vista frontal del andamio con porosidad graduada D) Vista frontal del andamio con aumento de 1000x tomada con microscopio digital.

Caracterización superficial del andamio (tamaños de poro, tipos de poro y porosidad) por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para el análisis de la superficie del andamio se tomaron imágenes por SEM como muestra la figura 12, con ellas se midió los tamaños de poro, utilizando el software *Image J*, se observó la superficie del andamio donde la figura 12A muestra una imagen panorámica de los tres tipos de poros señalado con las flechas, línea punteada corresponde al poro abierto, línea continua corresponde al poro ciego y la flecha sin línea corresponde a poro cerrado, la figura 12B es una imagen representativa de una de las zonas del andamio, la línea amarilla muestra el diámetro de un poro cerrado de 326.80 μm , la figura 12C muestra el diámetro de un poro ciego de 639.96 μm , la figura 12D muestra un poro abierto donde la línea amarilla cercana a la zona del centro del andamio tiene un diámetro de 474.667 μm ,

la línea amarilla de en medio mide 412.04 μm y la línea amarilla del borde tiene un diámetro de 234.38 μm .

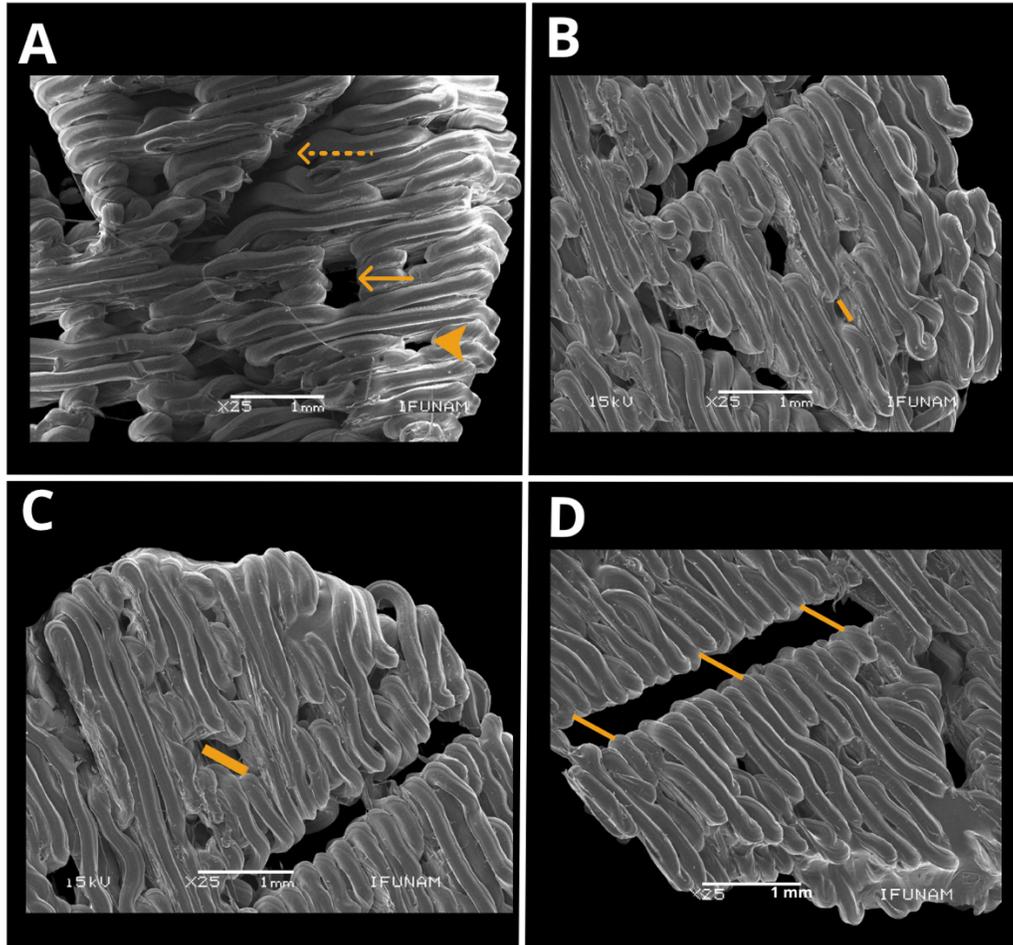
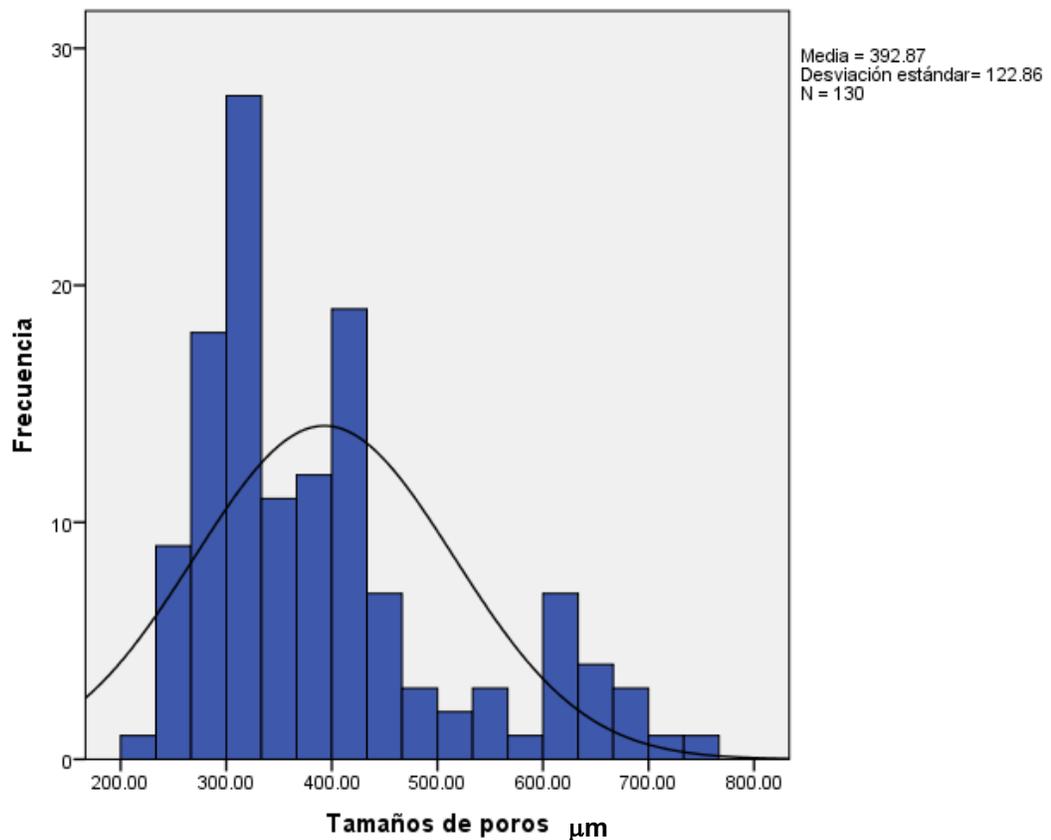


Figura 12. Superficie del andamio. A) Imagen panorámica de los tres tipos de poros señalado con las flechas, la línea punteada corresponde al poro abierto, la línea continua corresponde al poro ciego y la flecha sin línea es poro cerrado. B) La línea amarilla muestra el diámetro de un poro cerrado de 326.80 μm . C) La línea amarilla señala el diámetro de un poro ciego de 639.96 μm . D) Poro abierto la línea amarilla cercana a la zona del centro del andamio tiene un diámetro de 474.667 μm , la línea amarilla de en medio mide 412.04 μm y la línea amarilla del borde tiene un diámetro de 234.38 μm .

Porosidad graduada

De acuerdo con las medidas que se realizaron en las imágenes de SEM, se comprobó la porosidad graduada que consiste en tamaños de poros diferentes concentrándose los

tamaños de poro más grande en el centro del andamio y disminuyendo en los bordes. En la figura 13 nos muestra el intervalo de tamaño de poro de 200 μm como mínimo a 700 μm como máximo, siendo el tamaño de poro medio de 392.87 μm y el tamaño de poro más frecuente de 300 μm . La distribución de los tamaños de poro que se observa en el histograma (gráfica no. 1) confirma la porosidad graduada, donde la mayor cantidad de poros se encuentra en los diámetros del límite inferior, y van disminuyendo de frecuencia conforme se acercan a los diámetros del límite superior.



Gráfica No.1. Porosidad Graduada. El histograma muestra que los tamaños de poros, se encuentra dentro de los rangos establecidos como porosidad graduada (200 μm -700 μm), siendo la media de 392.87 μm y el tamaño de poro más frecuente de 300 μm cercano al límite inferior, lo que coincide con lo que se esperaba desde el diseño donde el mayor número de poros se encuentra en los bordes del andamio.

Comparación de los tamaños de poros impresos con los diseñados

Se realizó una prueba de normalidad de Kolmogorov-Sminov, donde la significancia fue menor a 0.05, lo que nos indica que los datos no siguen una distribución normal. Por lo tanto, se realizó una prueba de U-Mann-Whitney, donde la significancia fue de 0.913, los datos se consideraron estadísticamente significativos menores a $p=0.05$. Por lo tanto, se afirmó que se logró estandarizar los parámetros de impresión, que permitieron controlar los tamaños y formas de los poros. Todos los datos fueron analizados en el software SPSS.

4.1 Resultados *in vitro*

Se evaluó la estructura superficial de los constructos, los cuales fueron sometidas a un proceso de degradación *in vitro* a diferentes tiempos (0, 60, 100, 140 y 180 días). La Figura 13 es una imagen representativa en SEM de las 5 zonas que componen los andamios (columnas) a los diferentes días de degradación (filas), el objetivo de la evaluación fue encontrar modificaciones en la superficie de los andamios debido al proceso de degradación, el resultado que se obtuvo es que no hubo cambios drásticos en la superficie, es decir, del diseño inicial.

En la figura 13 se encuentran señalados con flechas amarillas algunos de los pocos cambios que se observaron en la superficie de los andamios al degradarse, en comparación con el grupo control que corresponde al día 0 (sin degradar), la flecha amarilla del día 60 en la zona 1, señala una zona de mayor rugosidad, en la zona 3 se muestra un limitado cambio en la forma de los poros, así como en la zona 4 y 5. En el día 100 zona 1, la flecha señala un filamento con mayor tortuosidad, en la zona 2 mayor rugosidad. En el día 140 zona 2, un limitado cambio en la forma del poro; mientras que en el día 160 zona 2, los poros aparentan tener un mayor espacio en el diámetro.

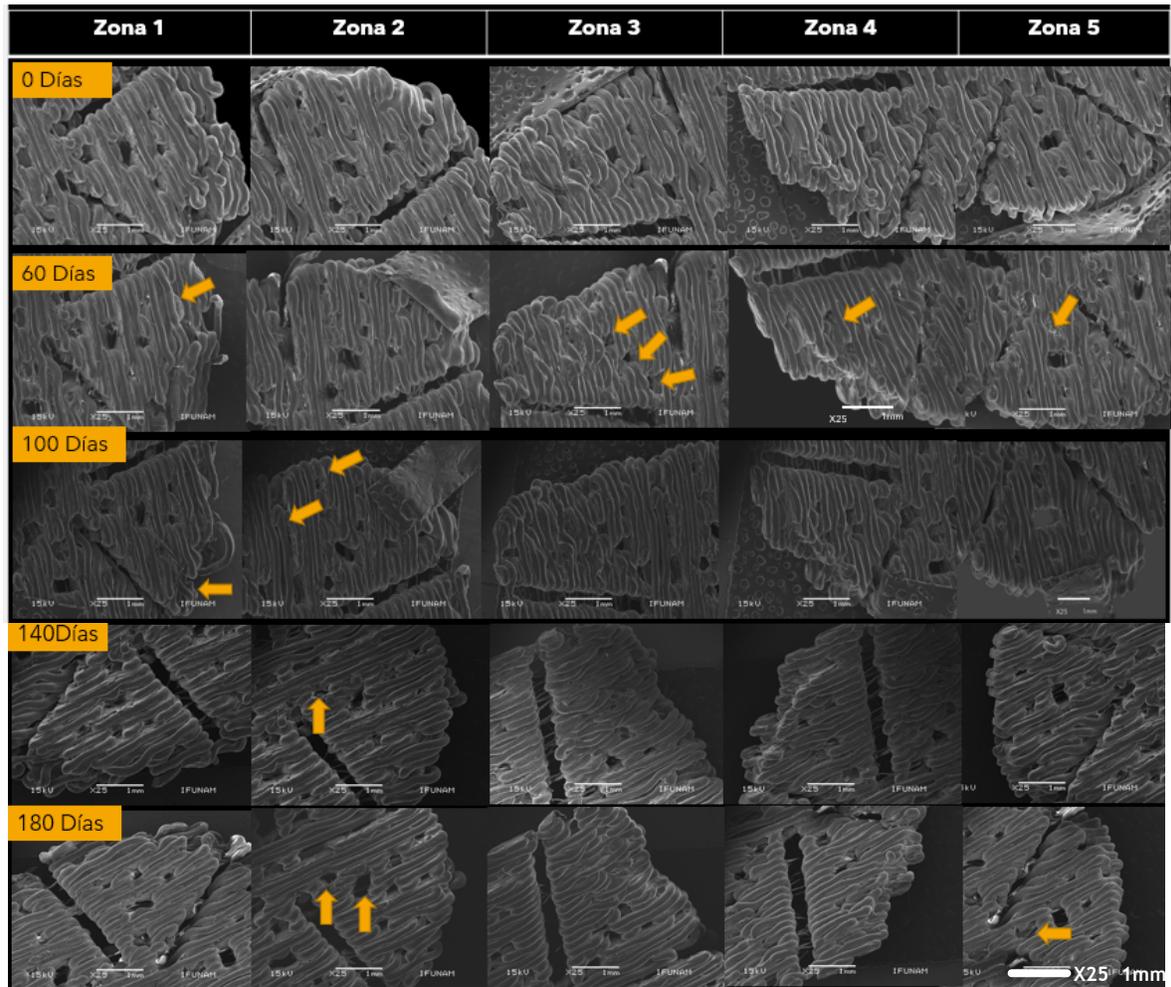
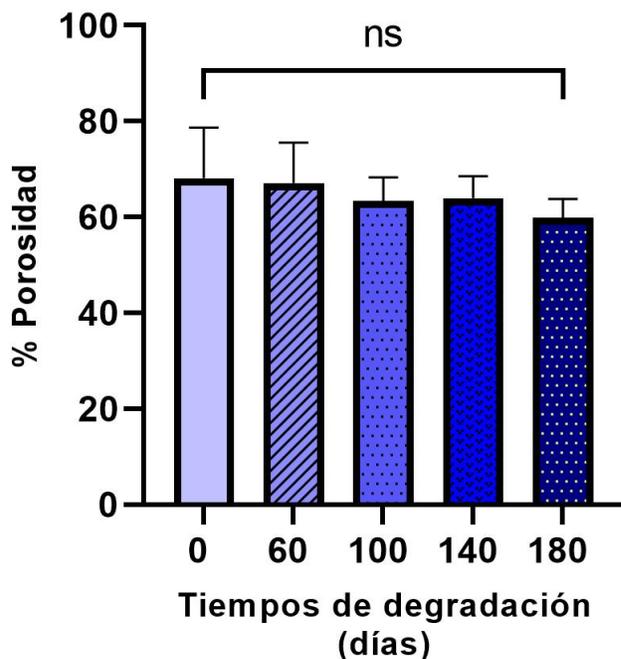


Figura 13. Superficie de los andamios degradados a diferentes tiempos. (0, 60, 100, 140 y 180). Imagen representativa en SEM de las 5 zonas que componen los andamios (columnas) a los diferentes días de degradación (filas), la flecha amarilla del día 60 en la zona 1, señala una zona de mayor rugosidad, en la zona 3 se muestra un limitado cambio en la forma de los poros, así como en la zona 4 y 5. En el día 100 zona 1, la flecha señala un filamento con mayor tortuosidad, en la zona 2 mayor rugosidad. En el día 140 zona 2, un limitado cambio en la forma del poro; mientras que en el día 180 zona 2, los poros aparentan tener un mayor espacio en el diámetro.

Porcentaje de porosidad

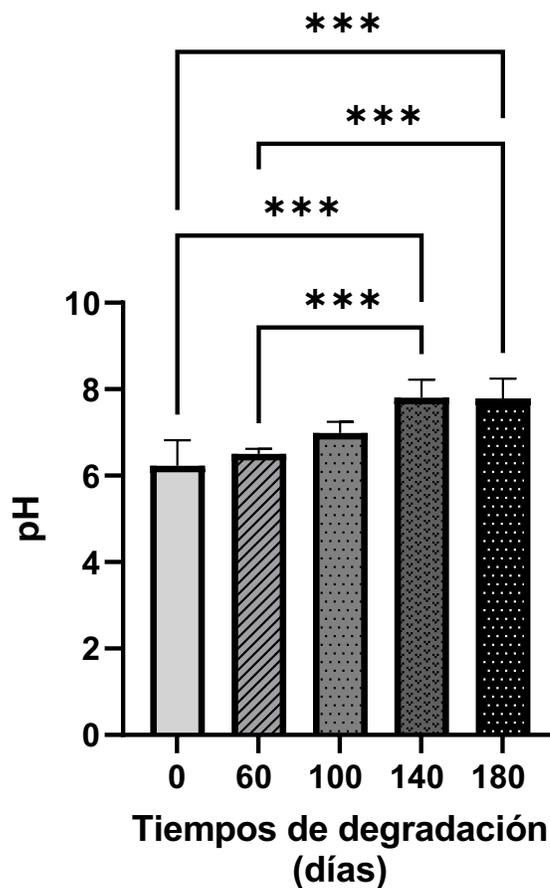
Se evaluó la porosidad de los andamios como una propiedad general, el objetivo fue evaluar si hubo alguna modificación en el porcentaje de porosidad, con respecto al tiempo de degradación como se muestra en la gráfica No.2, los resultados muestran que no hay diferencia estadística en el porcentaje de porosidad entre los grupos; el promedio fue de 64.5%. La prueba estadística que se realizó fue ANOVA de una sola vía, con prueba post hoc Tukey los datos se consideraron estadísticamente significativos menores a $p=0.05$.



Gráfica No.2. Porcentaje de porosidad de acuerdo con los tiempos de degradación. La gráfica muestra que no hubo diferencia significativa en el porcentaje de porosidad, entre los diferentes tiempos de degradación con un porcentaje promedio de 64.5%.

pH

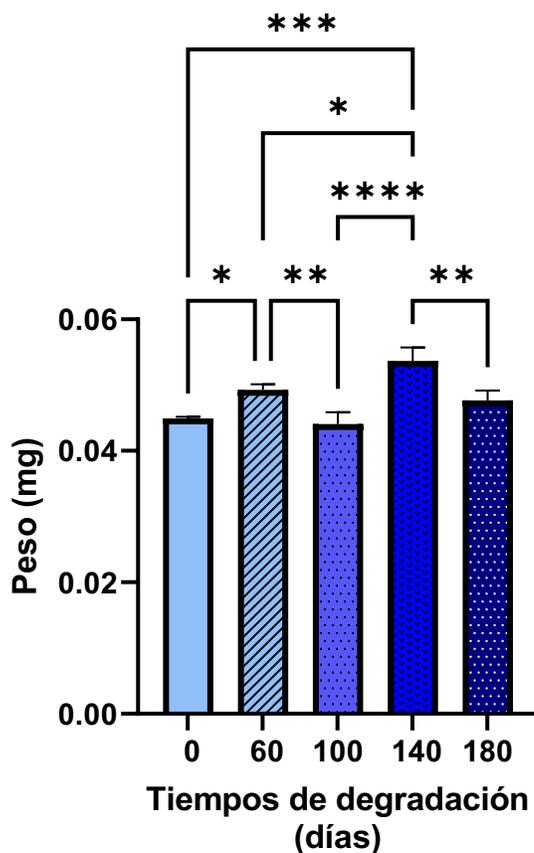
Se midió el pH de la solución de Lactato de Ringer Hartman, en donde estuvieron sumergidos los andamios a los diferentes días, los resultados mostraron que el pH en general se volvió más alcalino conforme aumentaron los tiempos de degradación, teniendo diferencias significativas el día 0, 60 en comparación con el día 140, 180, con un p valor <0.05 (*), $p<0.01$ (**) y $p<0.001$ (***). Se realizó un análisis estadístico de Kruskal-Wallis con prueba de Dunn.



Gráfica No.3 pH de la solución de Lactato de Ringer Hartmann. La gráfica representa el aumento de pH (alcalino) que mostró la solución de Lactato de Ringer Hartmann al estar sumergidos los andamios en la solución, a diferentes tiempos. Con diferencias estadísticas entre los tiempos, señaladas con asteriscos.

Peso

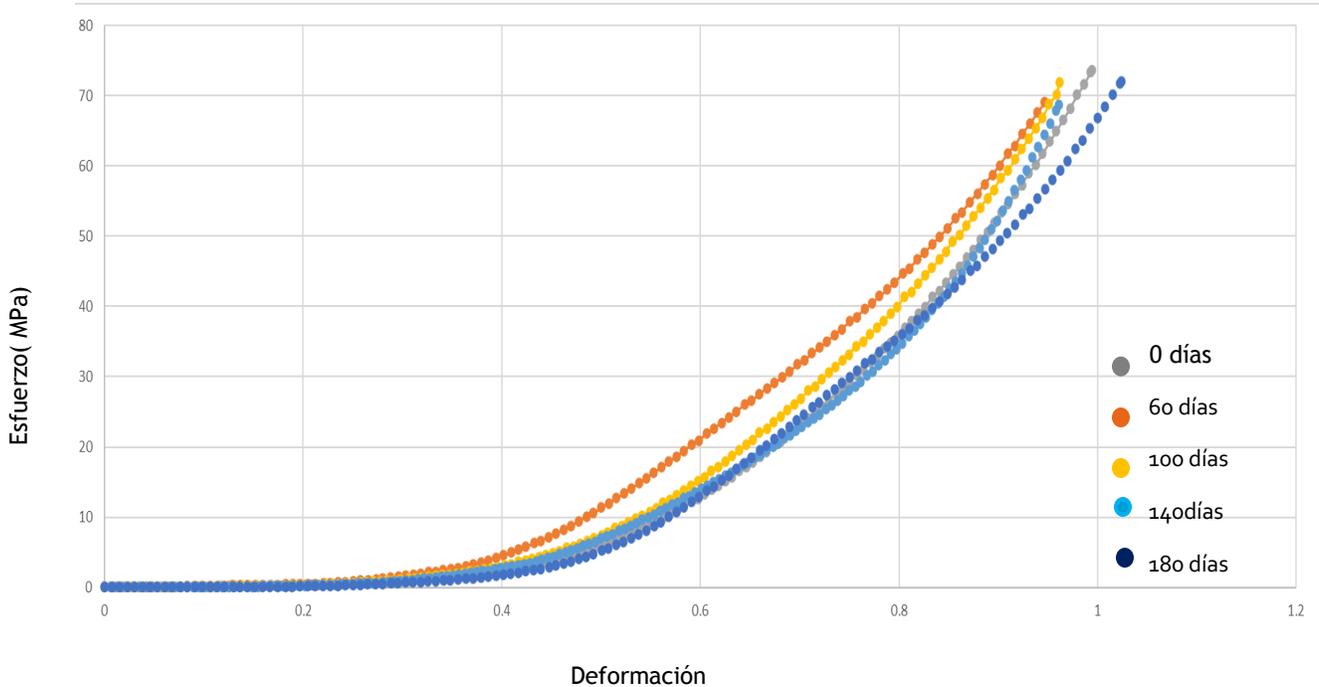
Se midió el parámetro de peso, con el objetivo de evaluar si hubo pérdida de este por el proceso de degradación. El análisis que se realizó fue de ANOVA de una sola vía con prueba post hoc Tukey cuyos, resultados demostraron que hubo diferencia estadística con el tiempo de degradación 0 con el día 60 y el día 140, el día 60 con el día 100 y 140, el día 100 con 140 y 180; finalmente el día 140 con el día 180 (como se muestra en la gráfica No. 4). Los resultados fueron estadísticamente significativos con un p valor <0.05 (*), p<0.01 (**), p <0.001 (***) y p <0.0001 (****).



Gráfica No 4. Peso de las muestras . La gráfica representa la medición de peso de los andamios al terminar el tiempo de degradación, cuyos resultados demostraron que hubo diferencia estadística con el tiempo de degradación 0 con el día 60 y el día 140, el día 60 con el día 100 y 140, el día 100 con 140 y 180; finalmente el día 140 con el día 180.

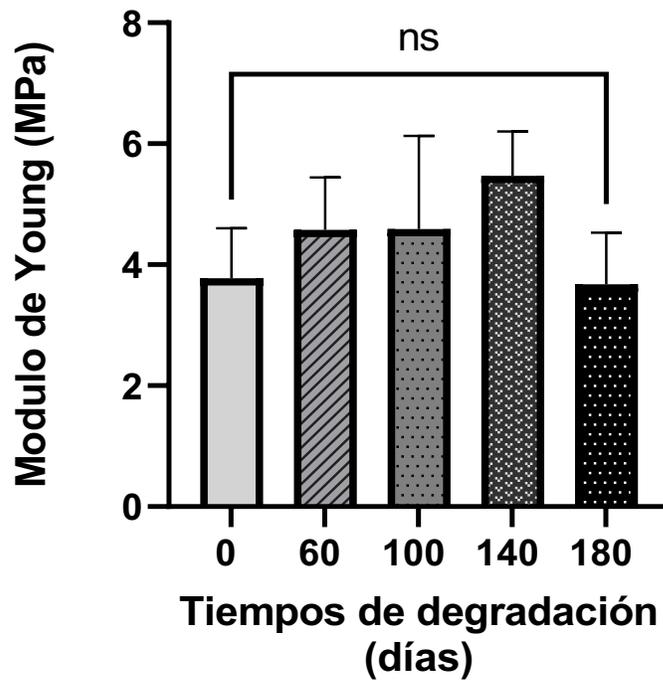
Propiedades mecánicas

Se evaluó las propiedades mecánicas, cuyos resultados se interpretan en la curva esfuerzo-deformación, observando que los andamios son altamente deformables elásticamente a esfuerzos muy bajos y sus curvas son muy semejantes entre sí.



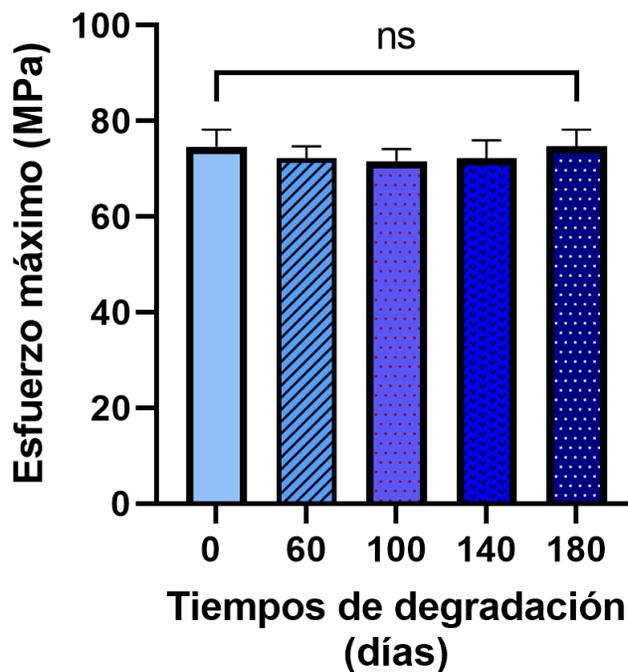
Gráfica No 5. Gráfica de curva esfuerzo-deformación de los andamios evaluados a diferentes tiempos de degradación.

Se calculó el Módulo de Young de los andamios a los diferentes días de degradación, donde el módulo de Young promedio en el día 0 fue 3.77 MPa, día 60 fue 4.57 MPa, día 100 fue 4.59 MPa, día 140 fue 5.46 MPa y día 180 fue 3.67 MPa, se realizó su respectiva prueba estadísticas ANOVA post hoc Tukey, donde se comprobó que no hay diferencia estadística entre los grupos.



Gráfica No 6. Módulo de Young . En esta gráfica se puede observar, que el proceso de degradación en términos generales no provocó diferencias estadísticas entre los diferentes grupos.

El esfuerzo máximo promedio, que presentaron los andamios con respecto al tiempo de degradación el día 0 fue 74.62 MPa, día 60 fue 72.184 MPa, día 100 fue 71.66 MPa, día 140 fue 72.2 MPa y finalmente del día 180 fue 74.712 MPa. Al realizar el análisis estadístico ANOVA de una vía con prueba post hoc Tukey se comprueba que no hubo diferencia estadística en ninguno de los grupos a evaluar.

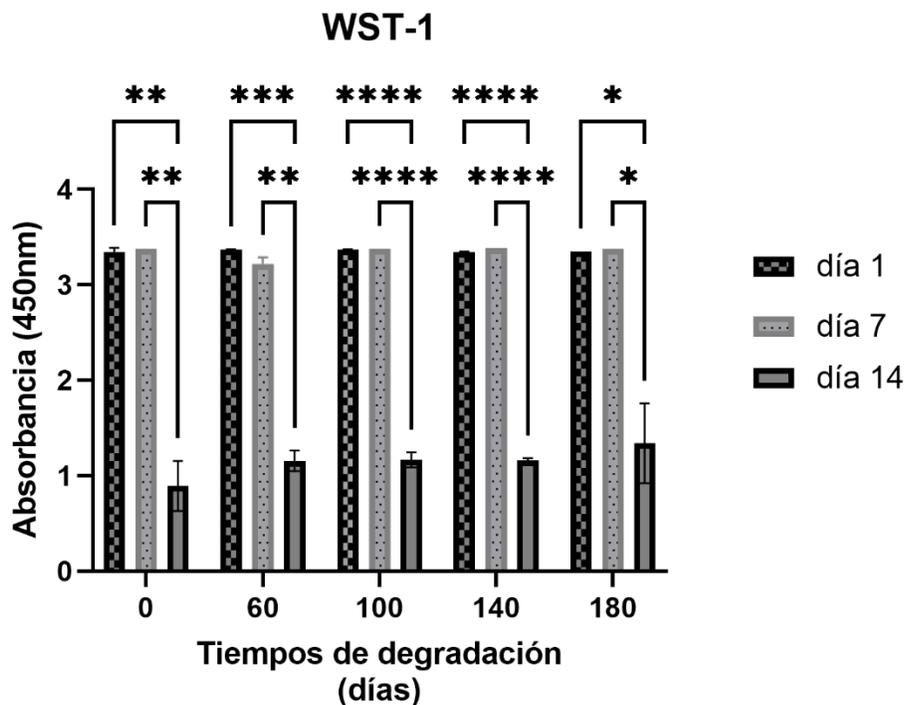


Gráfica No 7. Esfuerzo máximo . En esta gráfica se puede observar que, en todos los grupos no hay diferencia estadística entre ellos.

4.2 Resultados celular *in vitro*

Ensayo de WST-1

Se realizó un ensayo de WST-1, a los 7 y 14 días con el objetivo de evaluar la viabilidad celular. Las células DPSC fueron sembradas en los andamios degradados a diferentes tiempos. Donde podemos observar en la gráfica No. 8, que no hubo diferencias estadísticas entre los grupos, de acuerdo con el tiempo de degradación del día 1 y el día 7; sin embargo, hay diferencia estadística en todos los grupos en el día 14. Estos resultados corresponden a lo esperado, debido a que el pico de crecimiento celular se da en los primeros días, posteriormente suele disminuir debido a que las células empiezan a secretar matriz extracelular. Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías con su prueba post hoc de Tukey. Los resultados fueron estadísticamente significativos con un p valor <0.05 (*), p<0.01 (**), p <0.001 (***) y p <0.0001 (****).

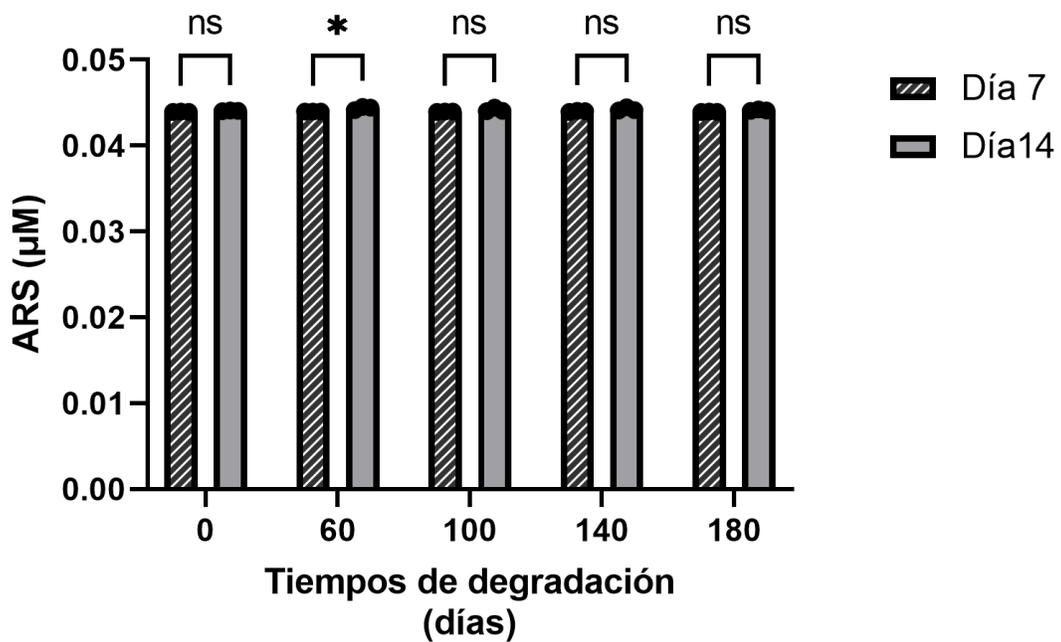


Gráfica No 8. Ensayo de WST-1 los días 1,7 y 14 días. Se puede observar en la gráfica, que no hubo diferencias estadísticas entre los grupos, de acuerdo con el tiempo de degradación del día 1 y el día 7, sin embargo, hay diferencia estadística en todos los grupos en el día 14.

Ensayo de Alizarina Roja

Se realizó un ensayo de Alizarina Roja, a los 7 y 14 días con el objetivo de evaluar la formación de depósitos de calcio sobre los andamios degradados a diferentes tiempos. En la figura 9, se realizó un análisis basado en la observación, en donde se puede ver los depósitos de calcio sobre los andamios, en todos los tiempos de degradación, la imagen permite observar nódulos de calcio en las superficies del andamio, concentrándose estos nódulos alrededor de los poros y en el espacio creado entre filamento-filamento, además se puede observar que conforme pasan los tiempos de degradación la tinción de alizarina es de mayor intensidad y también se puede distinguir un aumento en el color de la tinción en los andamios evaluados el día 14, lo que permite confirmar que las células DPSC secretaron matriz extracelular mineralizada.

En la gráfica No. 9, se cuantificó la concentración de Alizarina Roja, extraída de los andamios. Los resultados mostraron que no hubo diferencias estadísticas entre los días 7 y 14 de la evaluación y tampoco entre los grupos clasificados de acuerdo con los tiempos de degradación. El único con diferencias estadísticas corresponde al tiempo de degradación 60, con mayor concentración el día 14 con respecto al día 7 de evaluación. Se realizó una prueba estadística ANOVA de una sola vía con su respectiva prueba post hoc Tukey. Los resultados fueron estadísticamente significativos con un p valor <0.05 (*).

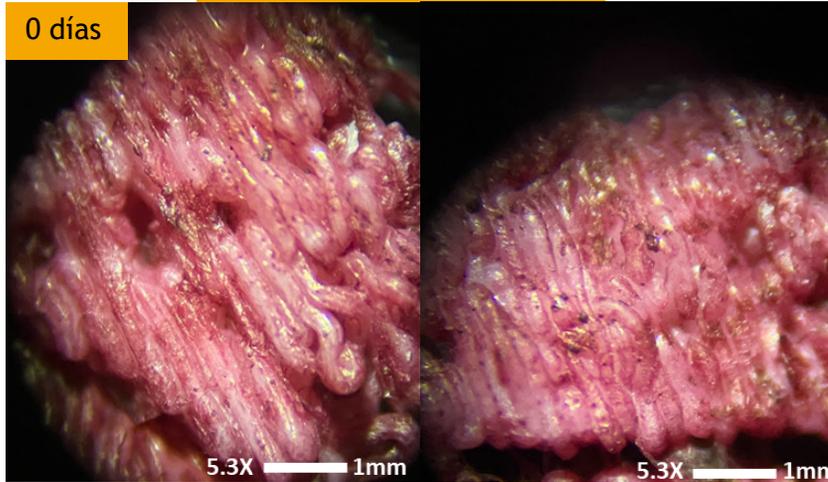


Gráfica No 9. Cuantificación de Alizarina Roja μM (días 7 y 14 días). Se puede observar en la gráfica, que no hubo diferencias estadísticas entre los grupos a los diferentes días, el único grupo con diferencias estadística corresponde con el día 60, donde el día 14 tuvo mayor concentración de alizarina con respecto al día 7.

Alizarina Roja (ARS)

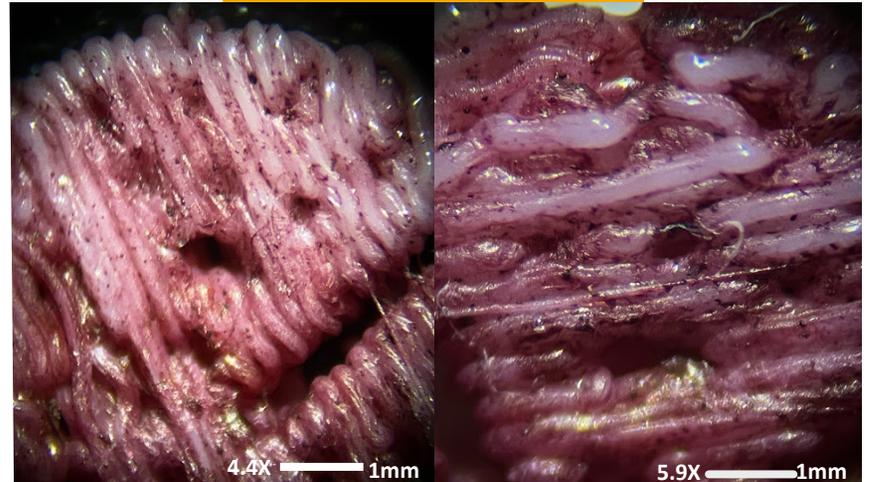
7 días

0 días

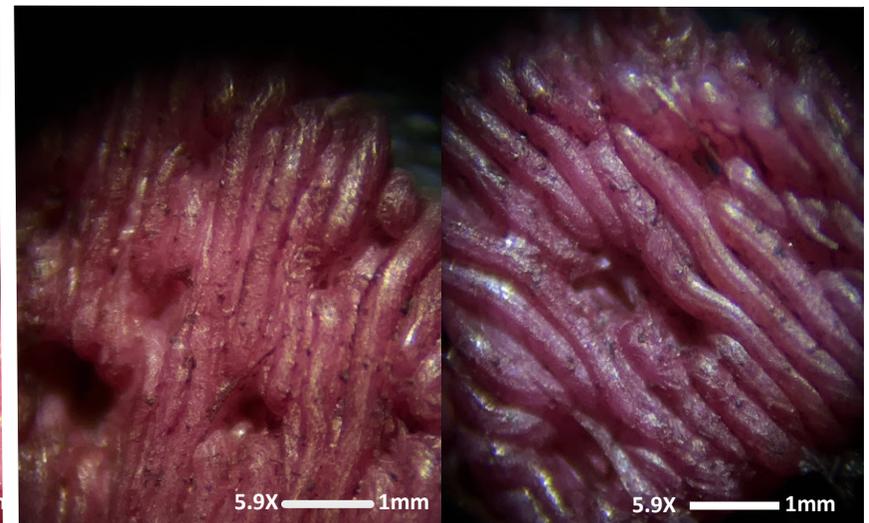
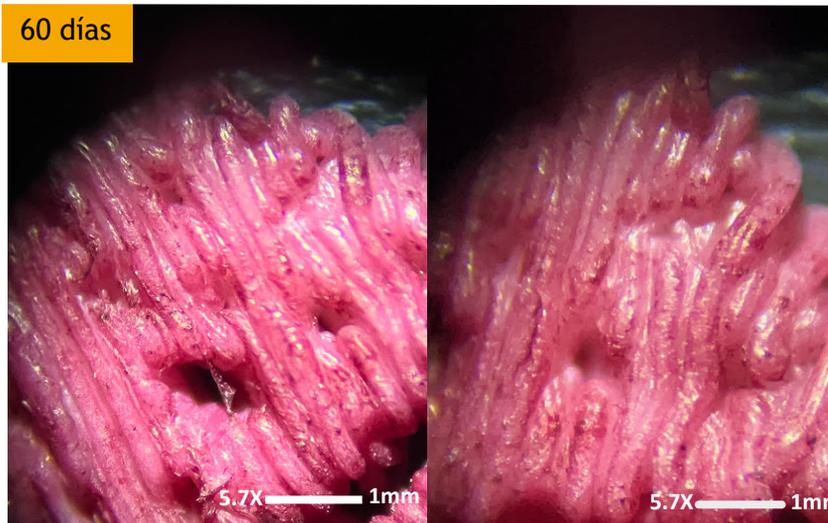


Alizarina Roja (ARS)

14 días

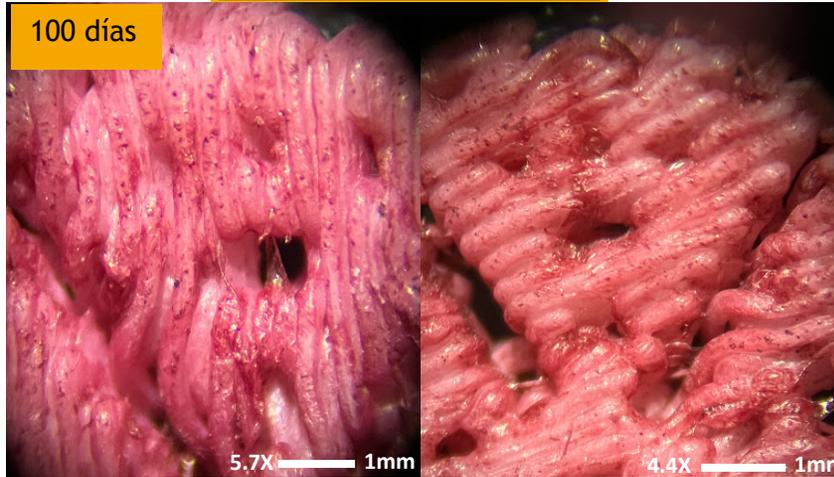


60 días



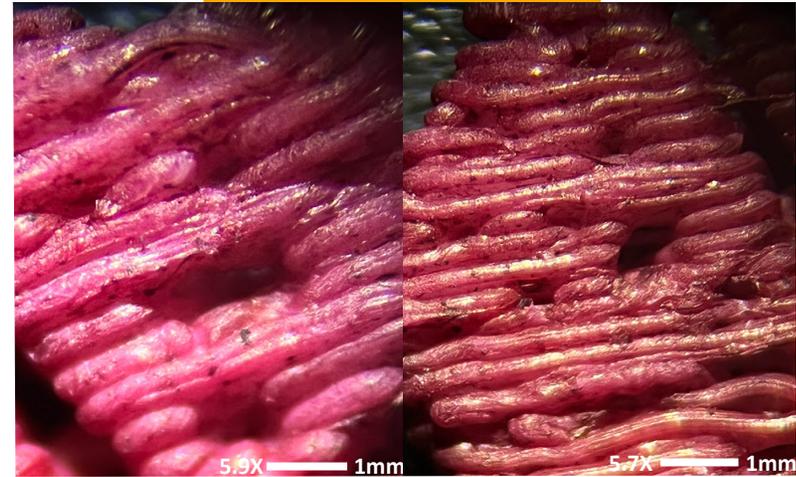
Alizarina Roja (ARS)

7 días

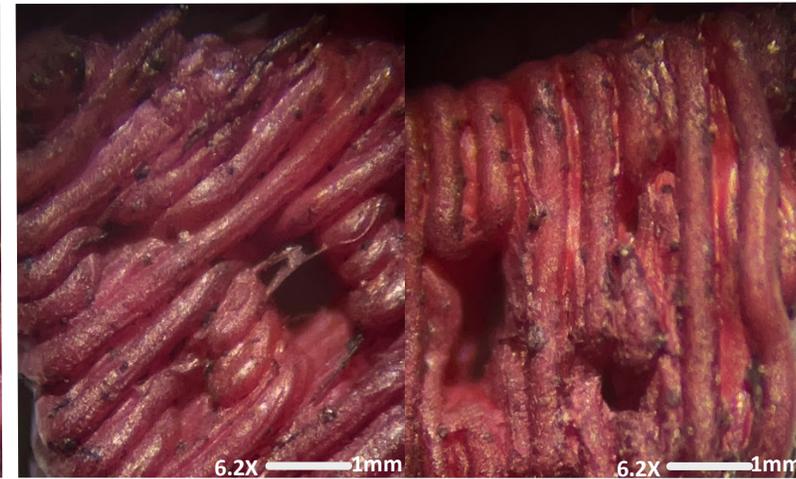
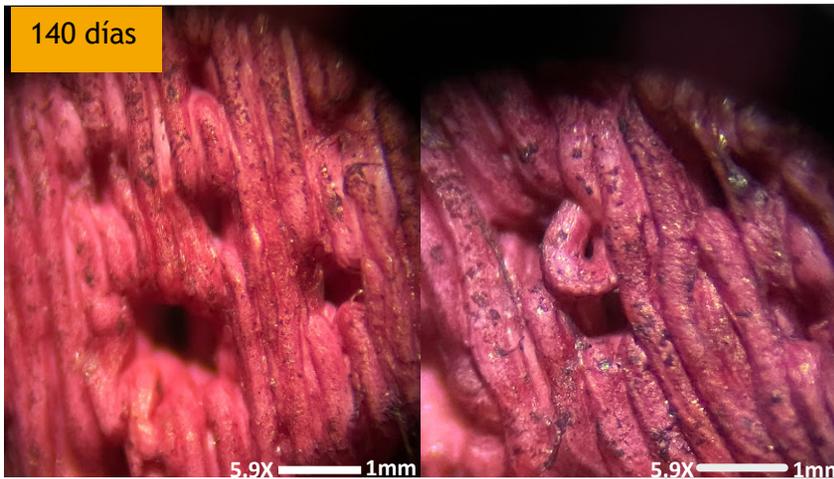


Alizarina Roja (ARS)

14 días



140 días



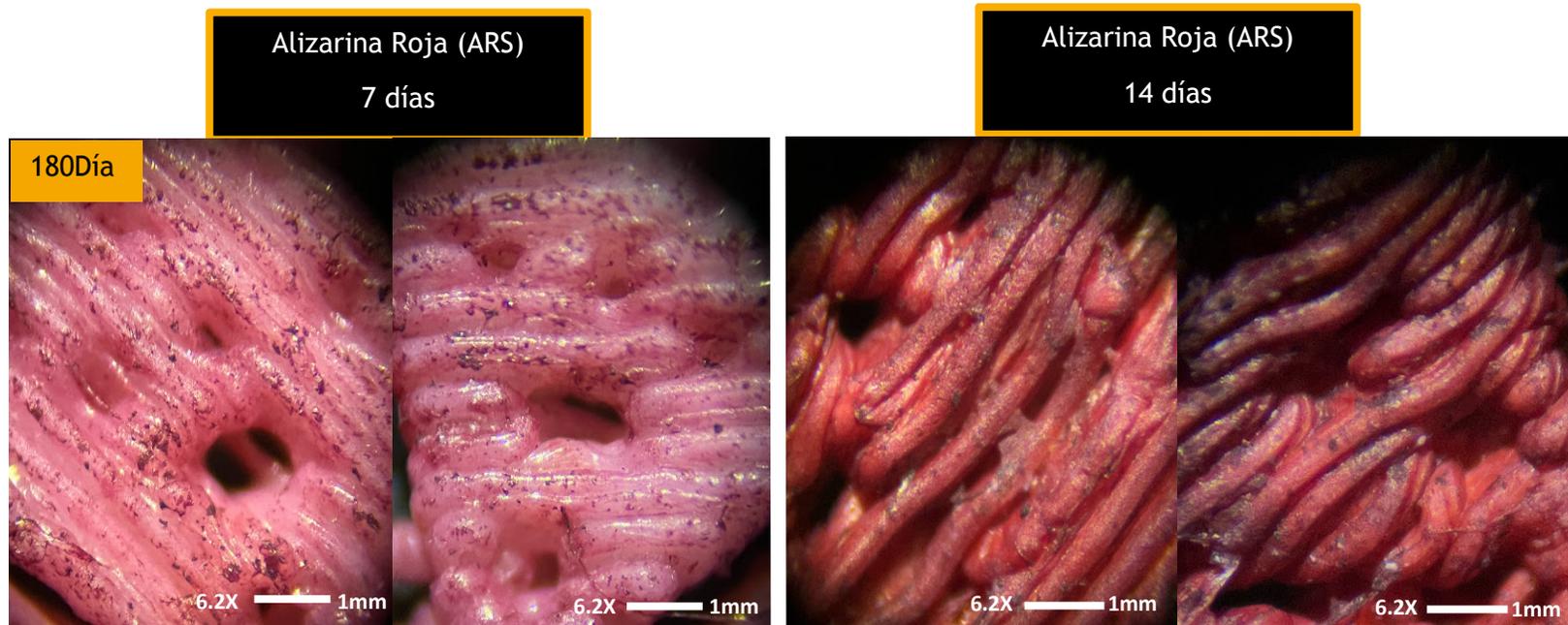
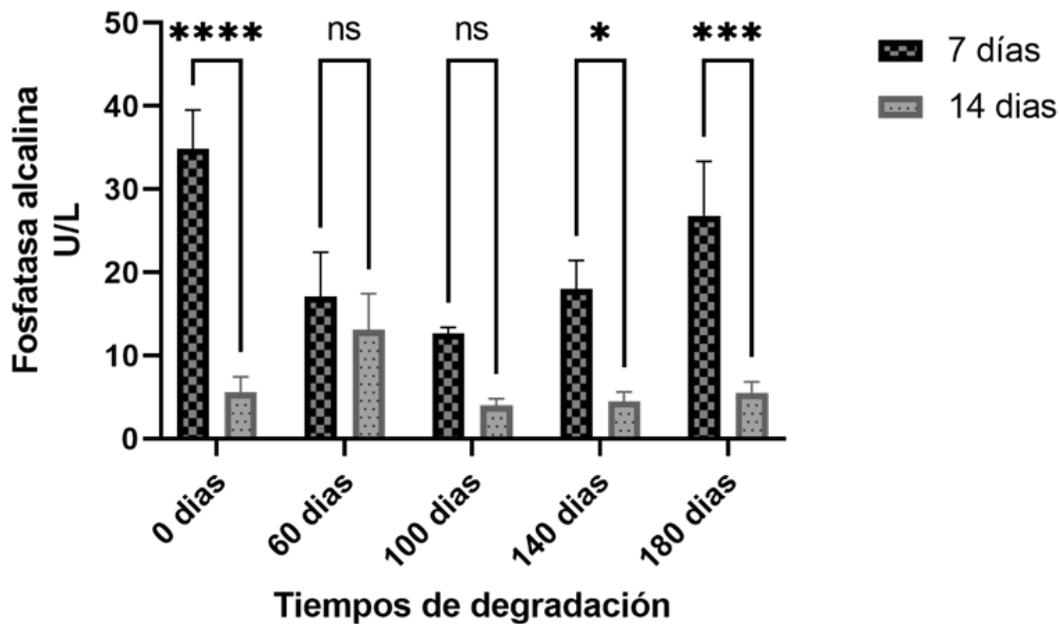


Figura 9. Imágenes representativas de los andamios degradados a los diferentes días, teñidos con Alizarina Roja. En la columna de lado izquierdo corresponde a la tinción realizada el día 7, del lado derecho corresponde a la tinción realizada el día 14, las filas corresponden a los tiempos en los que fueron sometidos a degradación los andamios (0, 60, 100, 140 y 180 días) en las imágenes se puede observar los depósitos de calcio en la superficie de los andamios en todos los tiempos los grupos experimentales de acuerdo con el tiempo de degradación a los que fueron sometidos, sin embargo, se observa mayor tinción en la mayoría de los andamios al ser evaluados al día 14.

Ensayo de fosfatasa Alcalina

Se realizó un ensayo de fosfatasa alcalina para evaluar, la actividad de esta enzima en las células DPSC con medio osteogénico, a 7 y 14 días. Se muestra en la gráfica No. 10 los resultados, donde se observa un incremento en la actividad el día 7 comparado con el día 14. Por otro lado, se observó que los únicos grupos que no tuvieron diferencia estadística entre los andamios con diferentes tiempos de degradación fueron el día 60 y el día 100. Sin embargo, se seleccionó el andamio del día 60 para ser utilizado en el modelo óseo *in vivo* debido a que su actividad enzimática no disminuyó drásticamente en comparación con los demás grupos. Se realizó prueba de ANOVA de dos vías con su post hoc de Tukey. Los resultados fueron estadísticamente significativos con un p valor <0.05 (*), $p<0.01$ (**), $p<0.001$ (***) y $p<0.0001$ (****).



Gráfica No 10. Ensayo de fosfatasa alcalina (ALP). Se puede observar en la gráfica, que no hubo diferencias estadísticas entre los grupos del día 60 y 90. Sin embargo se observa que el grupo que mantuvo una actividad similar el día 7 y 14 corresponde al tiempo de degradación del día 60.

4.3 Resultados del modelo óseo *in vivo*

Previo al procedimiento quirúrgico, se esterilizaron los andamios por plasma de peróxido de hidrógeno. Se realizaron los defectos de tamaño crítico en 20 ratas *Wistar*, formando cuatro grupos con 5 ratas cada uno. De acuerdo con los resultados obtenidos en la metodología celular *in vitro*, se seleccionó el andamio de 60 días de degradación para utilizarlo en los grupos experimentales 1 y 3 respectivamente.

- 1.- Grupo control: Andamio 3D con porosidad graduada y tres tipos de poro diferente sin degradación.
- 2.-Grupo experimental 1: Andamio 3D (con las características anteriormente descritas) degradado con células DPSC, previamente sembradas en medio osteogénico.
- 3.-Grupo experimental 2: Andamio 3D (con las características anteriormente descritas) sin degradar con células DPSC, previamente sembradas en medio osteogénico.
- 4.-Grupo experimental 3: Andamio 3D (con las características anteriormente descritas) degradado sin células.

Se implantaron los andamios en el defecto de tamaño crítico, de acuerdo con los grupos descritos con anterioridad. Por medio de imágenes microtomográficas, se realizó una evaluación descriptiva (30, 60 y 90 días) que permitió observar la formación de tejido *novo* dentro del defecto óseo.

En la figura 10, se puede observar una serie de imágenes representativas, en las filas se encuentran categorizadas por grupos experimentales y control, mientras que en las columnas se encuentran clasificados por los días de evaluación.

En el grupo control, día 30 se puede observar un tejido *novo* que atraviesa transversalmente el defecto óseo, con una radiodensidad similar a la del hueso nativo, en el día 60 y 90 aumentó la cantidad de tejido *novo* en el centro y bordes del defecto.

El grupo experimental 1, día 30 se puede observar una cantidad reducida de tejido *novo*, formándose en el borde superior del defecto, en el día 60 aumentó la cantidad de tejido dentro del mismo con una radiodensidad similar a la del hueso nativo, en el día 90 el tejido *novo* cubre la mitad del defecto, dirigiéndose del borde hacia el centro.

El grupo experimental 2, en el día 30 dentro del defecto se observa tejido *novo* en forma de puente, conectando el hueso nativo con el centro del defecto, en el día 60 se observa mayor cantidad de tejido *novo* con mayor cantidad de zonas de conexión con el hueso nativo, cubriendo el centro del defecto óseo, en el día 90 se observa un ligero aumento en la cantidad de tejido en comparación con el día 60.

El grupo experimental 3, en el día 30 se observa la formación de tejido *novo* en el centro del defecto, con una conexión (en forma de puente) con el tejido nativo, en el día 60 se observa mayor cantidad de tejido *novo* y más conexiones, éstas corresponden a tejido formado en los espacios creados por los microcanales o poros abiertos, lo que permite postular que los poros abiertos cumplieron la función de dirigir el tejido *novo* hacia el centro del defecto, en el día 90 se observa más del 50 % del defecto cubierto por el tejido, además la anatomía del tejido *novo* es similar a la de hueso nativo.

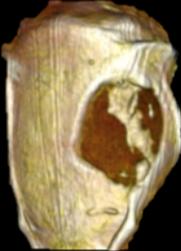
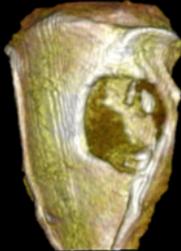
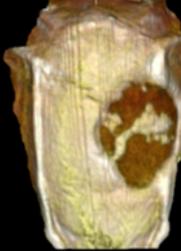
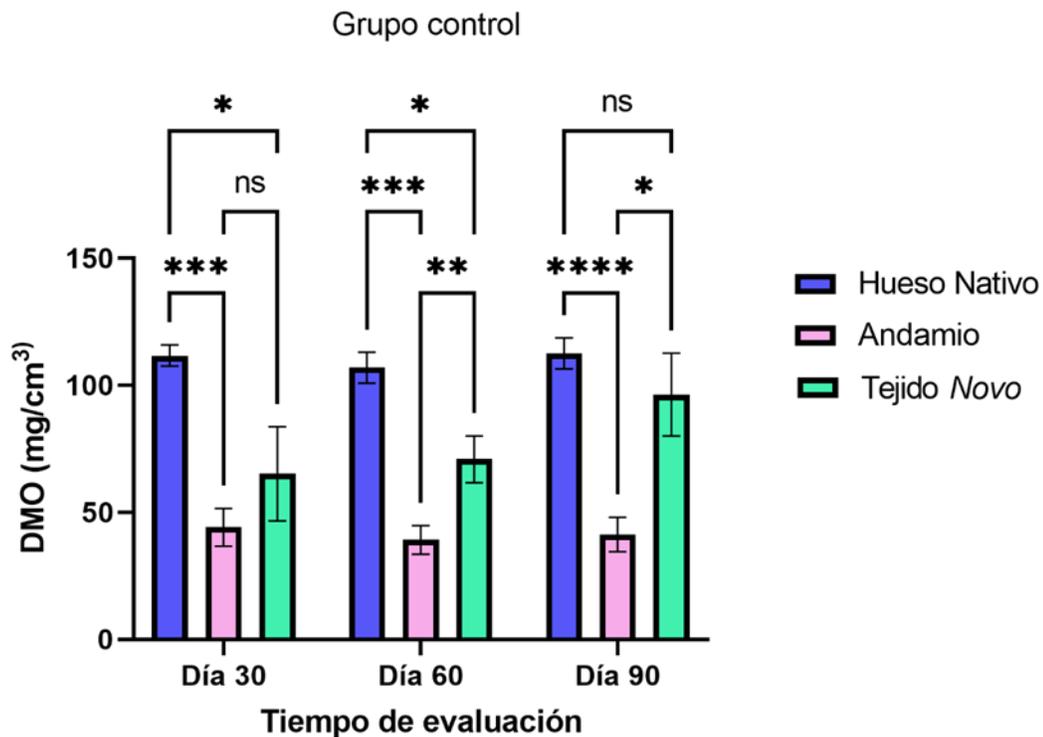
DÍAS	30 DÍAS	60 DÍAS	90 DÍAS
GRUPO CONTROL			
GRUPO EXPERIMENTAL 1			
GRUPO EXPERIMENTAL 2			
GRUPO EXPERIMENTAL 3			

Figura 14. Formación de tejido *novo* mineralizado. Imágenes representativas de la formación de tejido *novo* dentro del defecto, en las filas se encuentran categorizadas por grupos experimentales y control, mientras que en las columnas se encuentran clasificados por los días de evaluación

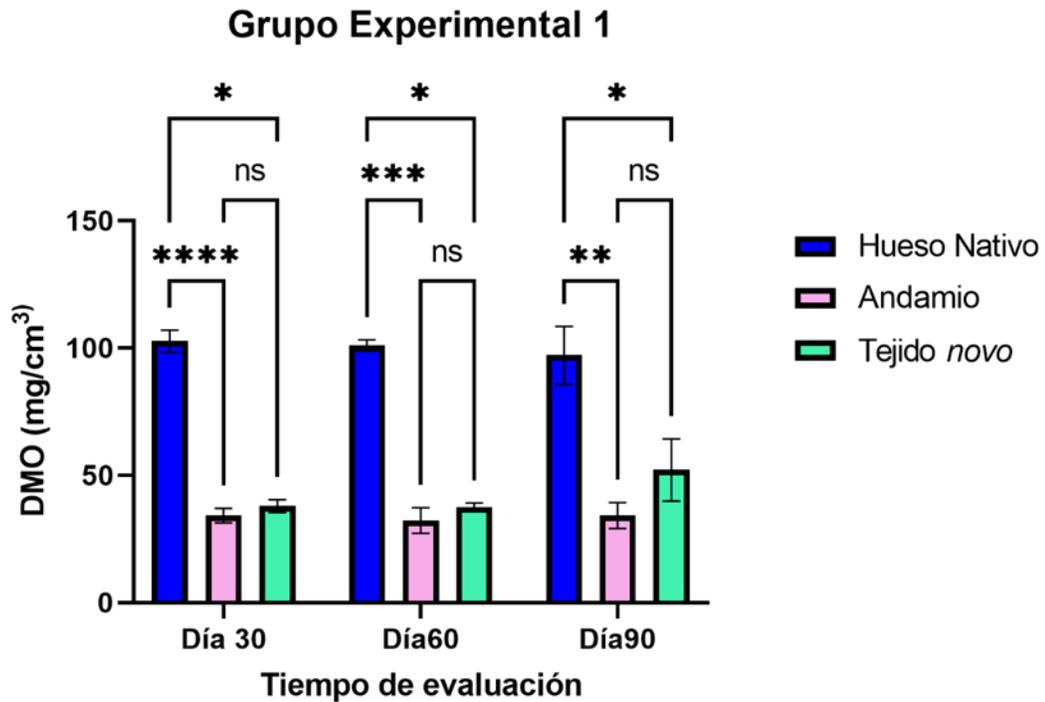
Para poder decir que el tejido *novo* que se observa en las imágenes de microtomografía es mineralizado, se midió la Densidad Mineral Ósea (DMO) de tres tejidos diferentes (hueso, andamio y tejido *novo*). Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de dos vías con prueba Post Hoc Tukey, para cada grupo experimental y control, utilizando el software Graphpad. Los resultados fueron estadísticamente significativos con un p valor <0.05 (*), p<0.01 (**), p <0.001 (***) y p<0.0001(****).

El primer grupo a describir corresponde al grupo control, donde se puede observar que la DMO del tejido *novo* (65.14 mg/cm³) a los 30 días no presenta diferencia estadísticamente significativa con respecto al andamio (44.13 mg/cm³); sin embargo, al día 60 el tejido *novo* (70.88 mg/cm³) aumenta su densidad y esto provoca que exista diferencia estadística con el andamio y también con el hueso nativo (106.94 mg/cm³), al día 90 podemos analizar en la gráfica que aumentó considerablemente la DMO del tejido *novo* (96.34 mg/cm³), provocando diferencia estadística con el andamio, pero no con el hueso nativo (112.53 mg/cm³) donde presenta una DMO sin diferencias significativas.



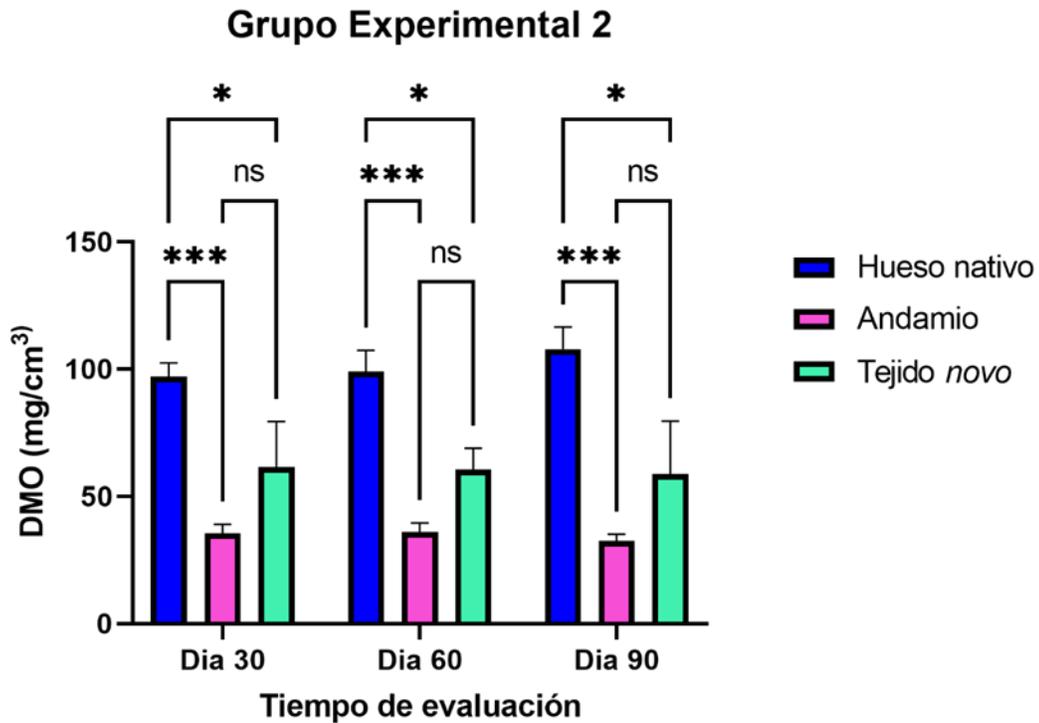
Gráfica No 11. Densidad Mineral Ósea (DMO) del grupo control. Se evaluó la DMO de tres tejidos (hueso nativo, andamio y tejido *novo*), la gráfica demuestra que a los 90 días el tejido *novo* tiene una densidad, similar a la de hueso, al no presentar diferencia estadística.

En el caso de grupo experimental 1, el tejido *novo* a los 30 días presentó una DMO de 37.95 mg/cm³, sin diferencias estadística con el andamio (34.14 mg/cm³), a los 60 días la DMO del tejido *novo* aumentó (37.76 mg/cm³) con diferencias con respecto al hueso nativo (100.97 mg/cm³), a los 90 días el tejido *novo* aumentó mínimamente (52.14 mg/cm³), con diferencias con respecto con el hueso nativo (99.63 mg/cm³).



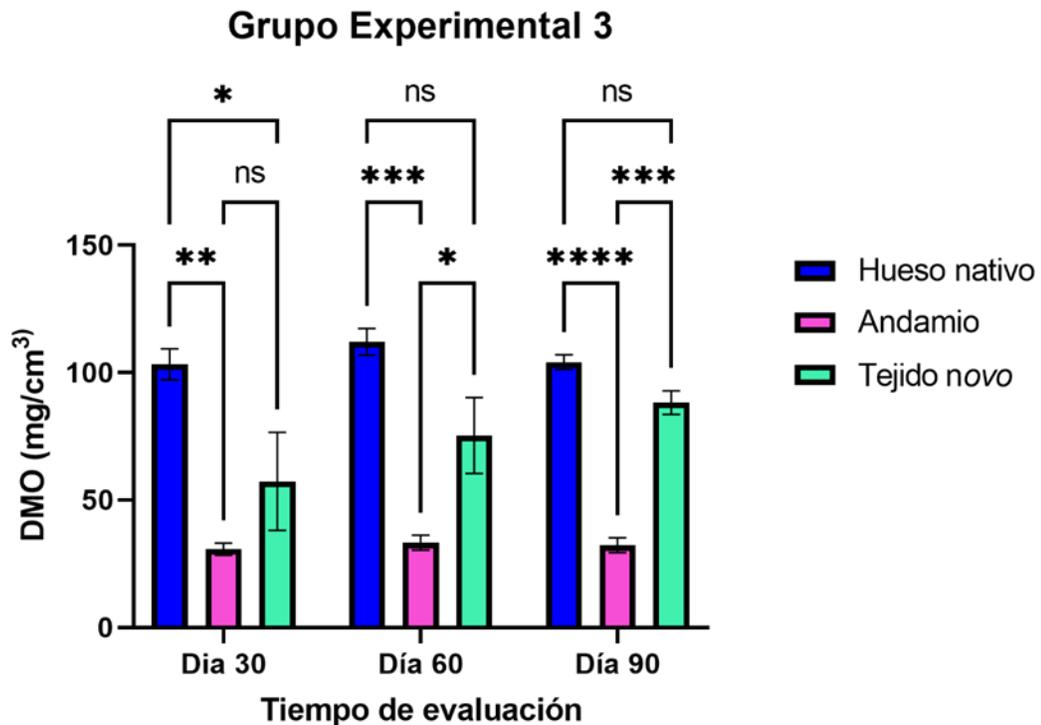
Gráfica No 12. Densidad Mineral Ósea (DMO) del grupo experimental 1. Se evaluó la DMO de tres tejidos (hueso nativo, andamio y tejido *novo*), la gráfica demuestra que a los 90 días el tejido *novo* tiene una densidad diferente a la de hueso.

En el grupo experimental 2, el tejido *novo* a los 30 días presentó una DMO de 61.59 mg/cm³ sin diferencias estadísticas con respecto al andamio (35.61 mg/cm³), a los 60 días el tejido *novo* presentó una DMO de 60.44 mg/cm³ sin diferencia con respecto al andamio; sin embargo, a los 90 días el tejido *novo* (58.76 mg/cm³) siguió presentando diferencias estadísticas con el hueso nativo (107.94 mg/cm³), es decir el tejido *novo* mantuvo una densidad diferente a la del hueso.



Gráfica No 13. Densidad Mineral Ósea (DMO) del grupo experimental 2. Se evaluó la DMO de tres tejidos (hueso nativo, andamio y tejido *novo*), la gráfica demuestra que a los 90 días el tejido *novo* tiene una densidad diferente a la de hueso.

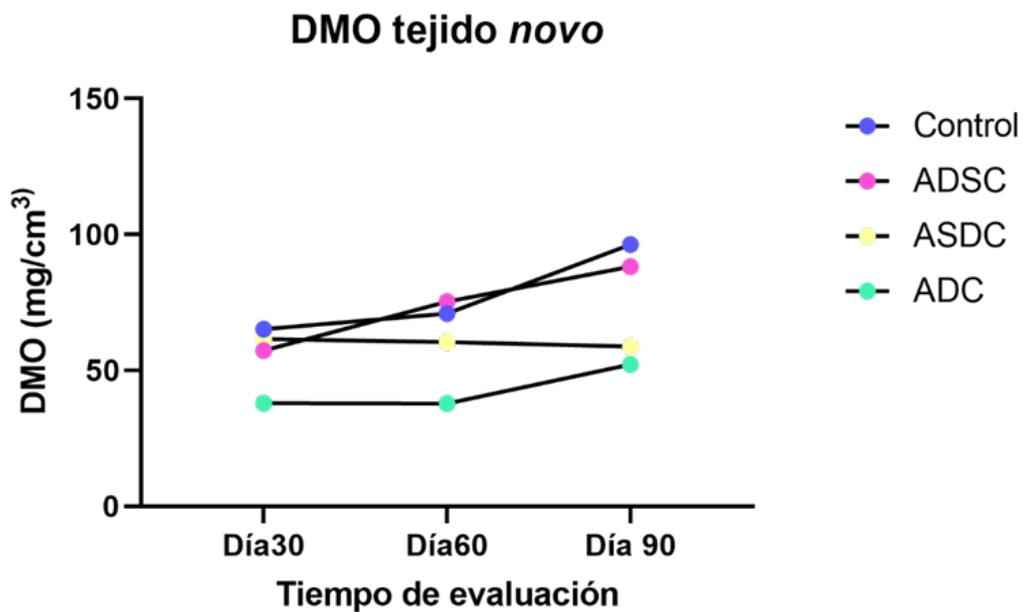
En el grupo experimental 3, el tejido *novo* a los 30 días presentó una DMO de 57.29 mg/cm³ sin diferencia estadística con el andamio 30.71 mg/cm³, a los 60 días se puede observar que aumentó la DMO del tejido *novo* (75.28 mg/cm³) provocando que no existiera diferencias estadísticas con el hueso nativo (112.02 mg/cm³). Por otro lado, a los 90 días el tejido *novo* (88.16 mg/cm³) aumentó su densidad, manteniendo una DMO similar a la del hueso nativo.



Gráfica No 14. Densidad Mineral Ósea (DMO) del grupo experimental 3. Se evaluó la DMO de tres tejidos (hueso nativo, andamio y tejido *novo*), la gráfica demuestra que a partir del día 60 el tejido *novo* tiene una densidad similar a la del hueso, aumentando dicha densidad en el día 90.

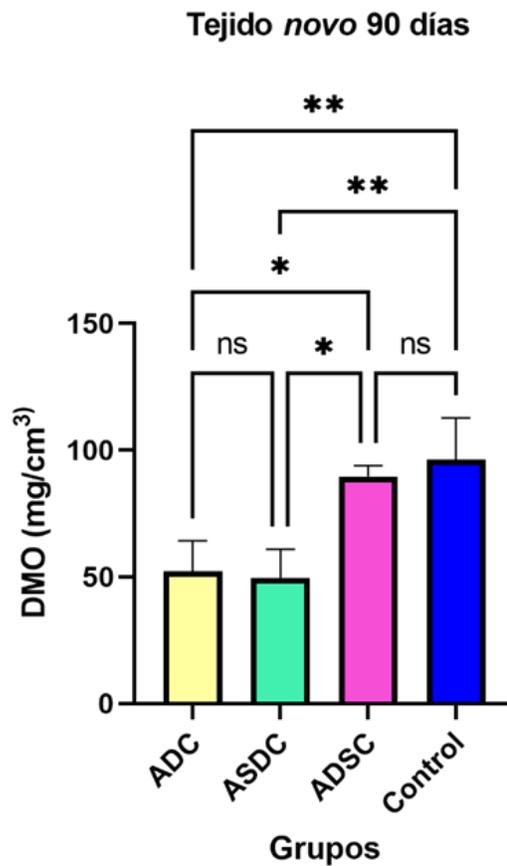
En la gráfica No. 15 se puede observar el comportamiento en general de la DMO del tejido novo en los diferentes grupos experimentales y control.

El grupo experimental 3 (ADSC) y control presentaron un comportamiento muy similar, se puede observar que en ambos grupos el tejido novo fue aumentando conforme pasaron los días, por otro lado el grupo experimental 1 (ADC), en el día 30 y 60 mantuvo una DMO constante aumentando en el día 90, mientras que el grupo experimental 2 (ASDC) en el día 30 mantuvo una DMO similar a la del grupo control y experimental 3, pero al pasar los días disminuye su densidad, provocando que a los 90 días fuera similar a la del grupo experimental 2.



Gráfica No 15. Densidad Mineral Ósea (DMO) de los grupos experimentales y control. Se evaluó la DMO de los cuatros grupos, donde se observa que el grupo experimental 3 (ADSC) y control tuvieron un comportamiento similar, aumentando su densidad conforme pasaron los días, mientras que el grupo experimental 1 (ADC) y experimental 2 (ASDC) presentaron una DMO similar al llegar a los 90 días.

En la gráfica No.16 representa la DMO del tejido *novo* a los 90 días , donde se puede observar que el grupo experimental 1 (ADC) y 2 (ASDC) no tienen diferencias estadísticas, mientras tanto el grupo experimental 3 y control no presentan diferencias significativas y son los dos grupos con mayor DMO, teniendo diferencias estadísticamente significativas con el grupo experimental 1 y 2. Estos resultados demuestran que los grupos experimentales sin células (ADSC y control) presentaron mejores resultados al presentar mayor DMO en comparación con los grupos experimentales con células (ADC y ASDC). La prueba estadística que se realizó fue ANOVA de una sola vía, con prueba post hoc Tukey. Los resultados fueron estadísticamente significativos con un p valor <0.05 (*), p<0.01 (**) y p <0.001 (***)).



Gráfica No 16. Densidad Mineral Ósea (DMO) de tejido *novo* a los 90 días. Se evaluó la DMO del tejido *novo* a los 90 días de los cuatro grupos. Donde se puede apreciar que el grupo control y el experimental 3 (ADSC) obtuvieron mejores resultados al presentar mayor DMO en comparación con los grupos experimentales con células (ADC y ASDC).

5. Discusión

La ingeniería de tejidos óseos es una disciplina que combina varias áreas, aplicando principios de la ingeniería y de la salud, con el objetivo principal de regenerar el tejido óseo perdido o dañado; a través del uso de andamios 3D, que son estructuras que funcionan como un marco para la adhesión, proliferación e incluso diferenciación celular (75,76)

En la actualidad se busca que los andamios cumplan con las características físicas y químicas que imitan el tejido nativo, a su vez que el diseño y fabricación de los andamios sea personalizado al tipo de defecto. Por tal motivo, el uso de la impresión 3D e imágenes médicas son unas herramientas esenciales para este fin. Además, los objetos impresos en 3D en el área de la salud, se han utilizado principalmente como modelos anatómicos (para fines de educación y capacitación), planificación quirúrgica (abordaje, estrategia quirúrgica y elección de un dispositivo), fabricación de implantes, prótesis y guías quirúrgicas(77)Sin embargo, en el área de ingeniería de tejidos óseos existen pocos casos clínicos donde se combinen ambas herramientas (imágenes médicas e impresión 3D) para su posterior implantación (78–81), esto se debe a que el hueso es un tejido complejo de imitar y por lo tanto de regenerar.

No obstante, dentro de los resultados presentados en este trabajo fue el diseño e impresión de andamios 3D adaptados de manera exacta al defecto óseo, a partir de una imagen microtomográfica, y otra serie de pasos que concuerdan con un flujo de trabajo digital (82) lo que ofrece una ventaja en el acercamiento con las ciencias básicas y la medicina traslacional.

Por otro lado, dentro de los objetivos de este trabajo fue la sinterización de andamios con una superficie heterogénea y porosidad graduada, es decir con tamaños de poro diferentes. Existe diversa literatura que reporta que los tamaños de poro que promueven la regeneración ósea se encuentran en el rango de 100 μm -1000 μm (83,84). Sin embargo, no hay un consenso del tamaño de poro ideal, algunos estudios revelan que el tamaño de poro que favorece la adhesión, proliferación e incluso influir en la diferenciación osteogénica se encuentra entre los 100 μm -400 μm (84,85) Mientras que el tamaño de poro que favorece la vascularización y con ello la difusión de oxígeno y nutrientes se encuentra entre los rangos de 500 μm -1000 μm (10,86,87)

Por lo tanto, en el diseño del andamio, se buscó que los poros más grandes se encontraran en el centro del andamio con un diámetro de 700 μm y 500 μm , mientras que los poros con diámetros más pequeños de 450-300 μm se localizaron en los bordes del andamio, con el objetivo de no limitar su funcionamiento considerando tanto la respuesta celular como el crecimiento vascular interno, ambas necesarias en cualquier proceso de regeneración.

Para la impresión de los andamios se utilizó, la tecnología de impresión 3D Modelado por Deposición Fundida (FDM), que es un método económico, conveniente, accesible en comparación con las otras tecnologías de impresión, conduce rápidamente al uso de andamios e implantes destinados a la regeneración ósea de manera personalizada (88) Dentro de las técnicas de Manufacturación Aditiva (AM) la FDM es la metodología que menor resolución tiene en comparación con las demás (89) lo que implica un reto para obtener estructuras complejas, como son la porosidad graduada de los andamios y los tamaños de poros presentados en este trabajo, incluyendo la concavidad y convexidad del defecto óseo. *Zhou et al.* (72) coincide acerca de la dificultad de imprimir estructuras altamente porosa debido a las limitaciones de la propia técnica, señalan que la resolución mínima de la técnica FDM generalmente supera los 100 μm debido a la resistencia a la alta presión en la boquilla/punta de impresión, siendo similar con las dificultades que se presentaron en este trabajo al imprimir los andamios con una punta de impresión de 200 μm , donde cada 50 impresiones se necesitó cambiar la boquilla debido a que se modificó el diámetro de orificio de salida. Sin embargo, en este proyecto se logró imprimir andamios exactos al defecto óseo, con tamaños de poro de 200 μm - 700 μm (gráfica No. 1) con tres tipos de poro diferentes, utilizando solamente la técnica de impresión 3D FDM, comprobando que no hay diferencias estadísticas entre los tamaños de poro impresos y los diseñados, afirmando que una impresora 3D comercial (FDM) puede controlar los tamaños y formas de los poros.

Además, para lograr una buena precisión dimensional en las piezas impresas con FDM, la configuración óptima de los parámetros del proceso es crucial, ya que varían según el material, la complejidad de la geometría de la pieza, el tipo de material y la composición química(90) En este proyecto se utilizó el polímero ácido poliláctico (PLA), el cuál en comparación con los otros materiales utilizados con la técnica FDM presenta más dificultad para controlar su precisión dimensional debido a su cambio de volumen y estrés residual causada por las altas temperaturas de fusión e impresión, por lo que la configuración de los parámetros clave puede disminuir dichas limitaciones(91).

De acuerdo con otros estudios, los parámetros del proceso se pueden dividir en tres conjuntos principales. El primer conjunto de datos incluye los parámetros relacionados con el proceso, el segundo incluye los relacionados con la máquina y el tercero está relacionado con la geometría de la pieza, la mayoría de los parámetros más importantes reportados por *Muhammad et al.* (92) (altura de la capa, perímetros, densidad de relleno, velocidad de impresión, temperatura de la boquilla y temperatura de la cama) coinciden con los parámetros modificados y reportados en este trabajo, exceptuando el ángulo de relleno de 90° y orientación de impresión de 90° sin embargo, en este proyecto se registraron otros parámetros complementarios véase Tabla 1. La importancia de estandarizarlos se debe a que influyen directamente en la calidad de la pieza, precisión dimensional y las propiedades mecánicas (90,92) en este estudio fueron indispensables para lograr imprimir los tamaños y formas de los poros en micras, además mantener su precisión dimensional con respecto al modelo óseo.

Como se mencionó con anterioridad, el tamaño de poro es importante; sin embargo, la forma y geometría de los poros también lo es. *Lutzweiler et al.* (86) señalan que los entornos tridimensionales porosos proporcionan varias señales que pueden afectar a las células. En las micrografías se observan los tres de tipos poros (cerrado, ciego y abierto) en 5 zonas diferentes de la superficie del andamio. De acuerdo con *Chung et al.* (10) el poro cerrado que está aislado dentro de la estructura, favorece la adhesión celular y migración de células nativas cercanas, por tal motivo estos poros se concentraron en los bordes del defecto, el poro ciego tiene una función similar al poro cerrado pero de mayor diámetro lo que puede favorecer la angiogénesis, estos poros se imprimieron en la zona del centro del andamio y finalmente poro abierto o microcanal que conectan la estructura interna con la externa, la superficie del andamio se divide por los microcanales con el objetivo de permitir el flujo de líquidos o gases, este último adquiere un papel importante en la vascularización(11)

Yu et al. (98) mencionan que uno de los parámetros desconocidos, es la dirección de los microcanales o poros abiertos del andamio con respecto al periostio y el hueso cortical, ya que es crucial para la regeneración ósea porque la capa de cambium del periostio contiene varias células y tejidos necesarios para la osteogénesis, como células progenitoras mesenquimales, células progenitoras osteogénicas diferenciadas, osteoblastos, redes vasculares y pericitos endoteliales. Cuando los extremos abiertos de los microcanales se dirigen al periostio, estas células y tejidos pueden entrar fácilmente en el andamio. Para conocer la influencia de la dirección del canal, es necesaria la fabricación de andamios con

microcanales controlados direccionalmente. La mayoría de estudios de los efectos de los microcanales en andamios tienen una orientación vertical, en este estudio debido a la forma del defecto y al grosor del andamio los canales o poros abiertos fueron fabricados horizontalmente en dirección al hueso nativo(11,93). A menudo se recomiendan microcanales de más de 300µm a 1mm de diámetro(94)En este trabajo el diámetro del poro abierto cercano al centro del andamio fue de $474.667 \pm 122.86 \mu\text{m}$, en la zona intermedia $412.04 \pm 122.86 \mu\text{m}$ y en el borde tuvo un diámetro de $234.38 \pm 122.86 \mu\text{m}$, las medidas estuvieron dentro de los rangos mencionados anteriormente.

Por otro lado, una vez impreso los andamios, fueron sometidos a un proceso de degradación *in vitro* con el objetivo de disminuir el tiempo de degradación del PLA, al implantarse en el modelo *in vivo* y así permitir la formación de tejido *novo*, el método de selección fue degradación hidrolítica ya que es menos invasiva y produce menos cambios drásticos en el andamio, en comparación con otras técnicas(12,95). Los parámetros que se evaluaron de los andamios, fue las modificaciones superficiales, el peso, el pH de la solución y las propiedades mecánicas.

Los cambios superficiales, que se observaron en las micrografías de acuerdo con los tiempos de degradación fueron mínimos, por otro lado, el parámetro de peso no fue concluyente, ya que se esperaba una pérdida de peso al aumentar el tiempo de degradación, como lo muestran en sus resultados *Spentlehaue et al.* (101) en donde las micrografías de sus esferas de PLA sometidas a un degradación hidrolíticas empezaron a deformarse después de las 12 semanas, cambiando su superficie lisa a una superficie alveolar, mientras que la pérdida de peso fue del 80% menos con respecto al valor inicial, a partir de 12 semanas, esta discordancia en los resultados permiten postular que se debe principalmente a la diferencia de peso molecular de los polímeros, en el caso del filamento de PLA fue 182,000 g/mol, mientras que el de las esferas de PLA del trabajo descrito con anterioridad fue 58,000-100,00 g/mol, además de los tamaños de las muestras que en el caso del estudio a comparar eran esferas de micras en comparación con los tamaños de los andamios en milímetros (96,97).

La temperatura también es un factor importante *Li et al.* (103) menciona que a una temperatura de 60 °C aumentó los cambios en los parámetros de degradación, de igual manera *Rodriguez et al.* (104) evalúan la degradación hidrolítica a diferentes temperaturas (60°C,70°C y 80°C), acelerando la degradación del material, por lo que se sugiere en futuras

aplicaciones aumentar la temperatura del proceso de degradación *in vitro* postulando que se obtendrán resultados más concluyentes(98,99).

Mientras tanto, el cambio de pH de la solución fue evidente al pasar los días de degradación, en general la solución se volvió más alcalina. Esto se debe a que el ácido láctico (ácido carboxílico) que es el principal producto de la degradación de PLA, en contacto con una solución Ringer Hartman se transformó en lactato y se alcalinizó la solución (100). Por lo que la medición del pH fue uno de los parámetros que comprobó que se efectuó un proceso de degradación en los andamios, mostrando diferencias estadísticas entre los grupos.

Otro parámetro importante es la porosidad que es el porcentaje de espacios vacíos de un sólido, los andamios presentaron un promedio de 64.5 % de porosidad, entre los diferentes tiempos de degradación, dentro de los cuales no hubo diferencias estadísticas, en comparación con el hueso cortical que tiene un 3-15 % porosidad, mientras que el hueso trabecular 50-90 %(10). El porcentaje de porosidad de los andamios coincide con la porosidad del hueso trabecular, y es mayor a la del hueso cortical de calvaria de rata que es el sitio del defecto que se pretende regenerar. Sin embargo, la porosidad es una medida indispensable para la permeabilidad de nutrientes e intercambio de oxígeno necesarios para cualquier proceso de regeneración, por lo que a pesar de que los andamios tengan una porosidad mayor a la del hueso cortical, puede beneficiar el proceso de regeneración como lo demuestra la literatura(101–103). La alta porosidad también afecta las propiedades mecánicas de los andamios como lo menciona *Karageorgiou et al.* (10) por lo cual se realizaron pruebas mecánicas.

Con respecto, a las propiedades mecánicas que presentaron los andamios, se evaluó el módulo de Young y el esfuerzo máximo, por medio de la curva tensión-deformación, cuyos resultados demuestran que no hubo diferencia significativa entre los grupos con respecto a su tiempo de degradación, presentando un módulo de Young promedio de 3.49 MPa y un esfuerzo máximo de 73.07 MPa, los datos que se obtuvieron de los andamios difieren con respecto al filamento de PLA, sobre todo en el módulo de Young, donde de acuerdo con *Ko et al.* (104) presenta un módulo de Young de 3100 MPa y un esfuerzo máximo de 74 MPa, lo que permite postular que está diferencia se debe al tamaño, grosor y alta porosidad que presentan los andamios impresos en este proyecto.

Por otro lado, en comparación con el tejido óseo cortical, que presenta un esfuerzo máximo de 131 MPa y el módulo elástico de 10,100 MPa;(105) se hace evidente que las

propiedades mecánicas de estos andamios impresos no son similares al hueso cortical, tejido al que va dirigido el uso de estos andamios. Sin embargo, es importante recordar que el hueso cortical del cráneo no recibe fuerzas mecánicas significativas, como sería el hueso cortical del fémur u otro sitio anatómico, por lo que esta diferencia en propiedades mecánicas no afecta las características osteoconductoras del andamio, como se demostró en el modelo óseo *in vivo*.

Una vez, evaluado sus propiedades mecánicas, se continuó con los resultados celulares *in vitro*, donde se realizaron ensayos de biocompatibilidad (WST-1), ensayo de alizarina roja (AR) y el ensayo de fosfatasa alcalina (ALP), con el principal objetivo de seleccionar el andamio degradado que mejor respuesta celular presentará, para continuar con el modelo óseo *in vivo*. Los resultados de biocompatibilidad mostraron que las células troncales derivadas de pulpa dental (DPSC), sembradas en los andamios impresos en 3D, degradados a diferentes tiempos, se mantuvieron viables el día 1 y 7, teniendo una disminución en el día 14, lo que coincide con un estudio anterior donde se utilizaron las mismas células a diferentes tiempos de evaluación (1, 3, 7, 14 y 21 días), disminuyendo su viabilidad a partir del día 14, el pico de crecimiento celular se da en los primeros días, posteriormente suele disminuir debido a que las células empiezan a secretar matriz extracelular(106). Por otro lado, no hubo diferencia estadística entre los andamios degradados a diferentes tiempos.

Con respecto al ensayo de Alizarina Roja, las micrografías muestran claramente nódulos de calcio sobre la superficie de los andamios, concentrándose en algunas zonas alrededor de los poros y entre el espacio formado entre filamentos, estas imágenes son similares a las presentadas por *Zhang et al.* (107) donde se concentraron los nódulos en sitios similares, lo que representa que las células DPSC sintetizaron una matriz extracelular mineralizada. Por otro lado, la concentración de Alizarina Roja que presentaron los andamios, no mostró diferencia estadística en la mayoría de los grupos experimentales, sólo en el día 60 de degradación, donde hubo mayor concentración en el día 14. (112). Existen varios estudios que confirman la capacidad de las células DPSC, para diferenciarse a células de linaje óseo y secretar matriz extracelular mineralizada(108–111).

En relación con los resultados del ensayo de fosfatasa alcalina, se observa un incremento en la actividad el día 7 comparado con el día 14. Por otro lado, los únicos grupos que no tuvieron diferencia estadística entre los andamios con diferentes tiempos de degradación fueron el día 60 y el día 100. Sin embargo, se seleccionó el andamio del día 60 para ser utilizado en el modelo óseo *in vivo* debido a que su actividad enzimática no disminuyó

drásticamente en comparación con los demás grupos. Dichos resultados permiten confirmar que las células DPSC se diferenciaron al linaje óseo. Los resultados de la metodología celular *in vitro* coinciden con los tiempos de expresión de la fosfatasa alcalina y la mineralización de la matriz extracelular presentados en el estudio de *Owen et al.*(112) donde los primeros días aumentó la proliferación (1-7 días), posterior disminuyó la proliferación, empezó la maduración de la matriz con la expresión de fosfatasa alcalina y empieza la mineralización (7-20 días) y calcificación (a partir de 21 días)

Con respecto a los resultados celular *in vitro* se puede concluir que las células DPSC mantuvieron su viabilidad y mostraron datos de diferenciación celular a linaje óseo, en todos los tiempos de degradación, no obstante, para confirmar dicha diferenciación es necesario realizar en un futuro experimentos moleculares como un PCR.

Una vez seleccionado el andamio degradado con mejor respuesta celular, y con el objetivo de evaluar su función osteoconductora, se continuó con el procedimiento quirúrgico que consistió, en implantar los andamios de acuerdo con lo descrito desde la metodología, donde la obtención de las imágenes microtomografías, permitió observar la formación de tejido *novo* en todos los grupos experimentales y grupo control, sin embargo se hizo evidente la mayor cantidad de tejido *novo* en el grupo control que consistió en el andamio con porosidad graduada y tres tipos de poro diferente sin degradación y sin células, así como en el grupo experimental 3 que consistió en el andamio 3D (con las características anteriormente descritas) degradado sin células, las imágenes microtomografías coincidieron con la evaluación de la Densidad Mineral Ósea (DMO), donde se demostró en el caso del grupo control que la DMO del tejido *novo* fue en aumentó conforme fueron pasando los días, provocando que a los 90 días de evaluación, el tejido *novo* no presentó diferencias estadísticas con el hueso nativo, permitiendo confirmar que el tejido *novo* es tejido mineralizado similar al del hueso. Semejante a estos datos ocurrió con el grupo experimental 3, donde a partir del día 30 el tejido *novo* ya no presentó diferencias estadísticas con respecto al hueso nativo y entre ambos grupos. A diferencia de otros estudios, como *Kwon et al.* (113) donde el uso de células DPSC sembradas en andamios impresos de PLCG tuvo mejor resultado en la formación de tejido *novo*; sin embargo, contrario a los resultados de este trabajo el andamio sin células tuvo una mínima cantidad de crecimientos internos similares a huesos en el área del defecto.

Por otro lado, los resultados del grupo experimental 1 y 2 que consistieron en los andamios degradado con células y sin degradar con células DPSC, previamente sembradas en medio

osteogénico, no fueron tan favorables como se esperaba, donde se pudo observar en las imágenes microtomográficas que el tejido *novo* que se formó fue de menor cantidad en comparación con los grupos sin células anteriormente mencionados, y además menor cantidad animales desarrollaron tejido en el centro del defecto, siendo una zona crucial para la regeneración. Dichos resultados coinciden con la evaluación de la DMO, donde el grupo experimental 1 y 2 no tuvieron una DMO similar al del hueso nativo al llegar a los 90 días. Una hipótesis de la causa por la cual hubo mejor respuesta osteoconductora en los grupos de andamios sin células, se debe a que las células DPSC; son células delicadas, que responden rápidamente a cualquier cambio de su entorno por lo tanto, el procedimiento quirúrgico implicó una lesión mecánica, provocando un posible inicio de muerte celular, retrasando la regeneración ósea al mantener un proceso inflamatorio crónico, esta hipótesis coincide con la planteada por *Gendviliene et al.* (114) . que las células DPSC implantadas en defectos óseos pueden morir por falta de vascularización sobre todo en el centro del defecto, además se cree que la formación de hueso se lleva a cabo en un entorno hipóxico en las etapas iniciales, ya que induce la producción de factores quimiotácticos implicados en la migración celular, la diferenciación y la formación de hueso nuevo; sin embargo, esta hipoxia fisiológica pudo provocar la muerte de las células DPSC(115,116). Otra hipótesis es que los defectos óseos *in vivo* tienen la posibilidad de fuga o pérdida de células trasplantadas debido al sangrado activo o la circulación sanguínea durante el proceso quirúrgico (117)Sin embargo, los andamios sintetizados en este proyecto sin células degradados y sin degradar, presentaron mejores resultados como osteoconductores, incluso se observa tejido *novo* en el centro del defecto, permitiendo postular que las características superficiales del andamio dio pauta a la regeneración ósea; siendo resultados prometedores para futuras aplicaciones en la ingeniería de tejido óseos. Es importante mencionar que se sugiere realizar estudios histológicos para análisis futuros.

5. Conclusiones

- ❖ Se diseñó e imprimió un andamio con características únicas que incluye porosidad graduada y tres tipos de poros diferentes, adaptándose de manera exacta a los defectos óseos, utilizando imágenes médicas, imprimiendo así un andamio personalizado al defecto óseo. Por otro lado, se controló tamaños y formas de los poros, utilizando una impresora 3D comercial con técnica de deposición fundida, compensando las limitaciones propias de la técnica, estandarizando parámetros no descritos con anterioridad en la literatura.
- ❖ Los andamios impresos en 3D, no mostraron diferencias estadísticas en sus características superficiales y mecánicas con respecto a la degradación *in vitro*. Sin embargo, en cuanto a su respuesta a nivel celular los ensayos de viabilidad celular fueron favorables todos los tiempos de degradación, mientras, que los ensayos de diferenciación celular tuvieron mejores resultados el día 60 de degradación. Sin embargo, se considera indispensable en futuras aplicaciones realizar ensayos de diferenciación celular a nivel molecular.
- ❖ Una vez implantados los andamios en los modelos animales, se observó en imágenes μ CT la formación de tejido *novo* en el centro del defecto óseo siendo una zona crítica de regeneración. Además, la DMO del tejido *novo*, fue similar al tejido nativo en los grupos experimentales sin las células, postulando que las características del andamio permitieron la osteoconducción, dando pauta a la regeneración ósea; siendo resultados prometedores para futuras aplicaciones en la ingeniería de tejido óseos.

6.- Referencias bibliográficas

1. Deguchi K, Zambaiti E, De Coppi P. Regenerative medicine: current research and perspective in pediatric surgery. *Pediatr Surg Int.* 2023;39(1):1-16.
2. Feng Y, Zhu S, Mei D, Li J, Zhang J, Yang S, et al. Application of 3D Printing Technology in Bone Tissue Engineering: A Review. *Curr Drug Deliv.* 2020;18(7):847-61.
3. Liu W, Liu S, Li Y, Zhou P, Ma Q. Biomimetic Design of 3D Printed Tissue-Engineered Bone Constructs. *Curr Nanosci.* 2020;17(2):223-40.
4. Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J.* 2016 1; 98:6-9.
5. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today.* 2011;14(3):88-95.
6. Baptista R, Guedes M. Morphological and mechanical characterization of 3D printed PLA scaffolds with controlled porosity for trabecular bone tissue replacement. *Materials Science and Engineering C.* 2021;118:111528.
7. Bajaj P, Schweller RM, Khademhosseini A. 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Annu Rev Biomed Eng.* 2014;(16):247-76.
8. Billiet T, Vandenhoute M, Schelfhout J, Van Vlierberghe S, Dubruel P. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering. *Biomaterials.* 2012;33: 6020-41.
9. Bracaglia LG, Smith BT, Watson E, Arumugasaamy N, Mikos AG, Fisher JP. 3D printing for the design and fabrication of polymer-based gradient scaffolds. *Acta Biomater.* 2017;56:3-13.
10. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005;26(27):5474-91.
11. Chung S, King MW. Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 2011;58:423-38.
12. Elsayy MA, Kim KH, Park JW, Deep A. Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* Elsevier Ltd.2017;79:1346-52.
13. Morad G, Kheiri L, Khojasteh A. ScienceDirect Dental pulp stem cells for in vivo bone regeneration : A systematic review of literature. *Arch Oral Biol.* 2013;(2013):1-10.
14. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS.*2000; 97(25):13625-13630.

-
-
15. Tatsuhiro F, Seiko T, Yusuke T, Reiko T toda. Dental Pulp Stem Cell-Derived, Scaffold-Free Constructs for Bone Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(7):1-13.
 16. Kwon DY, Park JY, Lee BY, Kim MS. Comparison of scaffolds fabricated via 3d printing and salt leaching: In vivo imaging, biodegradation, and inflammation. *Polymers (Basel)*. 2020;12(10):1-14.
 17. Ansari M. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Progress in Biomaterials*. 2019; 8:223-237.
 18. Mansour A, Mezour MA, Badran Z, Tamimi F. Extracellular Matrices for Bone Regeneration: A Literature Review. *Tissue Eng Part A*. 2017;23(23):1436-1451.
 19. Bisht B, Hope A, Mukherjee A, Paul MK. Advances in the Fabrication of Scaffold and 3D Printing of Biomimetic Bone Graft. *Annals of Biomedical Engineering*. Springer; 2021,49(4):1128-50.
 20. Donsante S, Palmisano B, Serafini M, Robey PG, Corsi A, Riminucci M. From stem cells to bone-forming cells. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8):1-23.
 21. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. Vol. 180, *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2018;180:143-62.
 22. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J Clin Periodontol*. 2019;46(S21):92-102.
 23. Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *SCIENCE*.1993;260:920-927.
 24. Shi R, Huang Y, Ma C, Wu C, Tian W. Current advances for bone regeneration based on tissue engineering strategies. *Frontiers of Medicine*. Higher Education Press; 2019;23:160-88.
 25. Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: Strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of Anatomy*. 2008; 213: 66-72.
 26. Qi J, Yu T, Hu B, Wu H, Ouyang H. Current biomaterial-based bone tissue engineering and translational medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021;22:10233.
 27. Malliappan SP, Yetisgin AA, Sahin SB, Demir E, Cetinel S. Bone tissue engineering: Anionic polysaccharides as promising scaffolds. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd; 2022;283: 119142.
 28. Hung Ben P, Hutton Daphne L, Grayson Warren L. Mechanical control of tissues-engineered bone. *Stem Cell Research & Therapy*. 2013;4(10):1-7.
 29. Du Y, Guo JL, Wang J, Mikos AG, Zhang S. Hierarchically designed bone scaffolds: From internal cues to external stimuli. *Biomaterials*. 2019;218:119334.

30. Rabel K, Kohal RJ, Steinberg T, Tomakidi P, Rolauffs B, Adolfsson E, et al. Controlling osteoblast morphology and proliferation via surface micro-topographies of implant biomaterials. *Sci Rep.* 2020;10(1):12810.
31. Dang M, Saunders L, Niu X, Fan Y, Ma PX. Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering. Vol. 6, *Bone Research*. Sichuan University; 2018;6(1):1-12.
32. King MW, Chen J, Deshpande M, He T, Ramakrishna H, Xie Y, et al. Structural Design, Fabrication and Evaluation of Resorbable Fiber-Based Tissue Engineering Scaffolds. *IntechOpen*.2023:1-30.
33. Bahraminasab M. Challenges on optimization of 3D-printed bone scaffolds. *BioMedical Engineering Online*. BioMed Central Ltd. 2020;19(1):1-33.
34. Su X, Wang T, Guo S. Applications of 3D printed bone tissue engineering scaffolds in the stem cell field. *Regenerative Therapy*. Japanese Society of Regenerative Medicine.2021;16: 63-72.
35. Kantaros A. 3D Printing in Regenerative Medicine: Technologies and Resources Utilized. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022;23(23):14621.
36. Anandhapadman A, Venkateswaran A, Jayaraman H, Veerabadran Ghone N. Advances in 3D printing of composite scaffolds for the repairment of bone tissue associated defects. *Biotechnology Progress*. John Wiley and Sons Inc.2022;38(3):e3234.
37. Khorsandi D, Fahimipour A, Abasian P, Saber SS, Seyedi M, Ghanavati S, et al. 3D and 4D printing in dentistry and maxillofacial surgery: Printing techniques, materials, and applications. *Acta Biomaterialia*. 2021;122:26-49.
38. Ansari MAA, Golebiowska AA, Dash M, Kumar P, Jain PK, Nukavarapu SP, et al. Engineering biomaterials to 3D-print scaffolds for bone regeneration: practical and theoretical consideration. *Biomaterials Science*. Royal Society of Chemistry.2022;10:2789-816.
39. Ranakoti L, Gangil B, Bhandari P, Singh T, Sharma S, Singh J, et al. Promising Role of Polylactic Acid as an Ingenious Biomaterial in Scaffolds, Drug Delivery, Tissue Engineering, and Medical Implants: Research Developments, and Prospective Applications. *Molecules*. MDPI.2023;28(2):485
40. Joseph TM, Kallingal A, Suresh AM, Mahapatra DK, Hasanin MS, Haponiuk J, et al. 3D printing of polylactic acid: recent advances and opportunities. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.2023;125:1015-35.
41. Singhvi MS, Zinjarde SS, Gokhale D V. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *Journal of Applied Microbiology*. John Wiley and Sons Inc. 2019; 127: 1612-26.
42. de Albuquerque TL, Marques Júnior JE, de Queiroz LP, Ricardo ADS, Rocha MVP. Polylactic acid production from biotechnological routes: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V.2021;186:933-51.

-
-
43. Swetha TA, Ananthi V, Bora A, Sengottuvelan N, Ponnuchamy K, Muthusamy G, et al. A review on biodegradable polylactic acid (PLA) production from fermentative food waste - Its applications and degradation. Vol. 234, International journal of biological macromolecules. NLM (Medline).2023;234:123703.
 44. Wang B, Wang S, Zhang Q, Deng Y, Li X, Peng L, et al. Recent advances in polymer-based drug delivery systems for local anesthetics. Acta Materialia Inc.2019;96:55-67.
 45. Lee S, Miyajima T, Sugawara-Narutaki A, Kato K, Nagata F. Development of paclitaxel-loaded poly(lactic acid)/hydroxyapatite core-shell nanoparticles as a stimuli-responsive drug delivery system. R Soc Open Sci. 2021;8(3): 202030.
 46. Zhang Q, Mochalin VN, Neitzel I, Knoke IY, Han J, Klug CA, et al. Fluorescent PLLA-nanodiamond composites for bone tissue engineering. Biomaterials. 2011;32(1):87-94.
 47. Shim IK, Jung MR, Kim KH, Seol YJ, Park YJ, Park WH, et al. Novel three-dimensional scaffolds of poly(L -lactic acid) microfibers using electrospinning and mechanical expansion: Fabrication and bone regeneration. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2010;95(1):150-60.
 48. Lauer A, Wolf P, Mehler D, Götz H, Rüzgar M, Baranowski A, et al. Biofabrication of SDF-1 functionalized 3D-printed cell-free scaffolds for bone tissue regeneration. Int J Mol Sci. 2020;21(6): 2175.
 49. Jaidev LR, Chatterjee K. Surface functionalization of 3D printed polymer scaffolds to augment stem cell response. Mater Des. 2019;161:44-54.
 50. Yeon YK, Park HS, Lee JM, Lee JS, Lee YJ, Sultan MT, et al. New concept of 3D printed bone clip (polylactic acid/hydroxyapatite/silk composite) for internal fixation of bone fractures. J Biomater Sci Polym Ed. 2018;29(7-9):894-906.
 51. Kulkarni A, Dasari H. Current Status of Methods Used In Degradation of Polymers: A Review. MATEC Web of Conferences. 2018;144:02023.
 52. Vaid R, Yildirim E, Pasquinelli MA, King MW. Hydrolytic degradation of polylactic acid fibers as a function of ph and exposure time. Molecules. 2021;26(24): 7554.
 53. Li G, Zhao M, Xu F, Yang B, Li X, Meng X, et al. Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid. Molecules. MDPI.2020,25:5023.
 54. Mishra VK, Shih HH, Parveen F, Lenzen D, Ito E, Chan TF, et al. Identifying the Therapeutic Significance of Mesenchymal Stem Cells. Cells. NLM (Medline). 2020;9(5):1145.
 55. Liu J, Gao J, Liang Z, Gao C, Niu Q, Wu F, et al. Mesenchymal stem cells and their microenvironment. Stem Cell Research and Therapy. BioMed Central Ltd; 2022;13(1):429.

-
-
56. Ma T, Chen Y, Chen Y, Meng Q, Sun J, Shao L, et al. MicroRNA-132, delivered by mesenchymal stem cell-derived exosomes, promote angiogenesis in myocardial infarction. *Stem Cells Int.* 2018;2018:1-12.
 57. Li T, Yan Y, Wang B, Qian H, Zhang X, Shen L, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells Dev.* 2013;22(6):845-54.
 58. Qi J, Zhou Y, Jiao Z, Wang X, Zhao Y, Li Y, et al. Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Tumor Growth Through Hedgehog Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2017;42(6):2242-54.
 59. Wang W, Guo H, Li H, Yan Y, Wu C, Wang X, et al. Interleukin-35 Gene-Modified Mesenchymal Stem Cells Protect Concanavalin A-Induced Fulminant Hepatitis by Decreasing the Interferon Gamma Level. *Hum Gene Ther.* 2018;29(2):234-41.
 60. Fregni G, Quinodoz M, Möller E, Vuille J, Galland S, Fusco C, et al. Reciprocal modulation of mesenchymal stem cells and tumor cells promotes lung cancer metastasis. *EBioMedicine.* 2018;29:128-45.
 61. Xie Z, Shen Z, Zhan P, Yang J, Huang Q, Huang S, et al. Functional dental pulp regeneration: Basic research and clinical translation. *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI.2021;22: 8991.
 62. Turkesen Kursad. *Cell Biology and Translational Medicine.* Springer. 2019;5:1-179.
 63. Meng Yuan Sheng, Yang Xue-Ting, Yuan Zhang Si, Dong Tian Wei, Yang Bo. Therapeutic potential of dental pulp stem cells and their derivatives: Insights from basic research toward clinical applications. *World J Stem Cells.* 2022;14(7):435-52.
 64. Chen YJ, Zhao YH, Zhao YJ, Liu NX, Lv X, Li Q, et al. Potential dental pulp revascularization and odonto-/osteogenic capacity of a novel transplant combined with dental pulp stem cells and platelet-rich fibrin. *Cell Tissue Res.* 2015;361(2):439-55.
 65. Magalhães FD, Sarra G, Carvalho GL, Pedroni ACF, Marques MM, Chambrone L, et al. Dental tissue-derived stem cell sheet biotechnology for periodontal tissue regeneration: A systematic review. Vol. 129, *Archives of Oral Biology.* Elsevier Ltd.2021;129:105182.
 66. Pedroni ACF, Sarra G, de Oliveira NK, Moreira MS, Deboni MCZ, Marques MM. Cell sheets of human dental pulp stem cells for future application in bone replacement. *Clin Oral Investig.* 2019;23(6):2713-21.
 67. Drewry MD, Dailey MT, Rothermund K, Backman C, Dahl KN, Syed-Picard FN. Promoting and Orienting Axon Extension Using Scaffold-Free Dental Pulp Stem Cell Sheets. *ACS Biomater Sci Eng.* 2022;8(2):814-25.
 68. Li D, Zou XY, El-Ayachi I, Romero LO, Yu Z, Iglesias-Linares A, et al. Human Dental Pulp Stem Cells and Gingival Mesenchymal Stem Cells Display Action Potential Capacity In Vitro after Neuronogenic Differentiation. *Stem Cell Rev Rep.* 2019;15(1):67-81.

69. Jensen J, Tvedesøe C, Rölfing JHD, Foldager CB, Lysdahl H, Kraft DCE, et al. Dental pulp-derived stromal cells exhibit a higher osteogenic potency than bone marrow-derived stromal cells in vitro and in a porcine critical-size bone defect model. *SICOT J*. 2016;2:16.
70. Lee YC, Chan YH, Hsieh SC, Lew WZ, Feng SW. Comparing the osteogenic potentials and bone regeneration capacities of bone marrow and dental pulp mesenchymal stem cells in a rabbit calvarial bone defect model. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20).
71. Fujii Y, Hatori A, Chikazu D, Ogasawara T. Application of Dental Pulp Stem Cells for Bone and Neural Tissue Regeneration in Oral and Maxillofacial Region. *Stem Cells International*. Hindawi Limited; 2023;2023:1-11.
72. Zhou X, Zhou G, Junka R, Chang N, Anwar A, Wang H, et al. Fabrication of polylactic acid (PLA)-based porous scaffold through the combination of traditional bio-fabrication and 3D printing technology for bone regeneration. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. 2021;197:111420
73. Felfel RM, Poczka 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. *Biomedical Materials (Bristol)*. 2016;11(1):1-15.
74. De la Rosa-Ruiz MDP, Álvarez-Pérez MA, Cortés-Morales VA, Monroy-García A, Mayani H, Fragosó-González G, et al. Mesenchymal stem/stromal cells derived from dental tissues: A comparative in vitro evaluation of their immunoregulatory properties against t cells. *Cells*. 2019;8(12):1491.
75. Wan Z, Zhang P, Liu Y, Lv L, Zhou Y. Four-dimensional bioprinting: Current developments and applications in bone tissue engineering. Vol. 101, *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc. 2020; 101:26-42.
76. Valtanen RS, Yang YP, Gurtner GC, Maloney WJ, Lowenberg DW. Synthetic and Bone tissue engineering graft substitutes: What is the future? *Injury*. 2021;52:S72-7.
77. Giannopoulos AA, Cai T, George E, Wake N, Ho VB, Grant GT, et al. Medical 3D Printing for the Radiologist. *Radiographics*. 2015; 35(7):1965.
78. Roque R, Barbosa GF. Design and 3D bioprinting of interconnected porous scaffolds for bone regeneration. An additive manufacturing approach. 2021;64:655-63.
79. Ben D, Tan P. Novel 3D polycaprolactone scaffold for ridge preservation - a pilot randomised controlled clinical trial. *Clin. Oral Impl. Res*. 2014:1-7.
80. Zhang B, Wang L, Song P, Pei X, Sun H, Wu L, et al. 3D printed bone tissue regenerative PLA/HA scaffolds with comprehensive performance optimizations. *Mater Des*. 2021;201:109490.
81. Di Luca A, Ostrowska B, Lorenzo-Moldero I, Lepedda A, Swieszkowski W, Van Blitterswijk C, et al. Gradients in pore size enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional scaffolds. *Sci Rep*. 2016;6:1-13.

-
-
82. Maroulakos M, Kamperos G, Tayebi L, Halazonetis D, Ren Y. Applications of 3D printing on craniofacial bone repair: A systematic review. *J Dent.* 2019;80:1-14.
 83. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2019;76(17):3323-48.
 84. Swanson WB, Omi M, Zhang Z, Nam HK, Jung Y, Wang G, et al. Macropore design of tissue engineering scaffolds regulates mesenchymal stem cell differentiation fate. *Biomaterials.* 2021;272:120769.
 85. Cheng A, Schwartz Z, Kahn A, Li X, Shao Z, Sun M, et al. Advances in Porous Scaffold Design for Bone and Cartilage Tissue Engineering and Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2019;25(1):14-29.
 86. Lutzweiler G, Halili AN, Vrana NE. The overview of porous, bioactive scaffolds as instructive biomaterials for tissue regeneration and their clinical translation. *Pharmaceutics.* 2020;12(7):1-29.
 87. Bobbert FSL, Zadpoor AA. Effects of bone substitute architecture and surface properties on cell response, angiogenesis, and structure of new bone. *J Mater Chem B.* 2017;5(31):6175-92.
 88. Cheng L, Shoma Suresh K, He H, Rajput RS, Feng Q, Ramesh S, et al. 3d printing of micro-and nanoscale bone substitutes: A review on technical and translational perspectives. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:4289-319.
 89. George E, Liacouras P. Measuring and Establishing the Accuracy and Reproducibility of 3D Printed Medical Models 1. *Radiographics.* 2017;(5):1425.
 90. Mohamed OA, Masood SH, Bhowmik JL. Optimization of fused deposition modeling process parameters: a review of current research and future prospects. *Adv Manuf.* 2015;3(1):42-53.
 91. Liu Z, Wang Y, Wu B, Cui C, Guo Y, Yan C. A critical review of fused deposition modeling 3D printing technology in manufacturing polylactic acid parts. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology.* 2019;102(9-12):2877-89.
 92. Abas M, Habib T, Noor S, Salah B, Zimon D. Parametric Investigation and Optimization to Study the Effect of Process Parameters on the Dimensional Deviation of Fused Deposition Modeling of 3D Printed Parts. *Polymers (Basel).* 2022;14(17).
 93. Yu T, Liu Q, Jiang T, Wang X, Yang Y, Kang Y. Channeled β -TCP Scaffolds Promoted Vascularization and Bone Augmentation in Mandible of Beagle Dogs. *Adv Funct Mater.* 2016;26(37):6719-27.
 94. Kang Y, Chang J. Channels in play for vascularization a porous scaffold : a new. 2018;13:705-15.

-
-
95. Kulkarni A, Dasari H. Current Status of Methods Used In Degradation of Polymers: A Review. *MATEC Web of Conferences*. 2018;144:02023.
 96. Spenlehauer' G, Vert M, Benoit JP, Boddaert\$ A. In vitro and in vivo degradation of poly(D,L lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method. *Biomaterials* 1989;10:557.
 97. Orellana-Barrasa J, Tarancón S, Pastor JY. Effects of Accelerating the Ageing of 1D PLA Filaments after Fused Filament Fabrication. *Polymers (Basel)*. 2023;15(1):69.
 98. Li S, Mccarthy S. Further investigations on the hydrolytic degradation of poly (DL-lactide). *Biomaterials*. 1999;20: 35–44.
 99. Rodriguez EJ, Marcos B, Huneault MA. Hydrolysis of polylactide in aqueous media. *J Appl Polym Sci*. 2016 Nov 20;133(44):44152.
 100. Ministerios de Sanidad política social e igualdad. Ficha Técnica 1. Solución Lactato de Ringer Hartmann Braun. Solución para perfusión intravenosa.
 101. He X, Liu Y, Yuan X, Lu L. Enhanced healing of rat calvarial defects with MSCs loaded on BMP-2 releasing chitosan/alginate/hydroxyapatite scaffolds. *PLoS One*. 2014;9(8):e104061.
 101. He X, Liu Y, Yuan X, Lu L. Enhanced healing of rat calvarial defects with MSCs loaded on BMP-2 releasing chitosan/alginate/hydroxyapatite scaffolds. *PLoS One*. 2014;9(8):e104061.
 102. Yao Q, Cosme JGL, Xu T, Miszuk JM, Picciani PHS, Fong H, et al. Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation. *Biomaterials*. 2017;115:115-27.
 103. Aronin CEP, Sadik KW, Lay AL, Rion DB, Tholpady SS, Ogle RC, et al. Comparative effects of scaffold pore size, pore volume, and total void volume on cranial bone healing patterns using microsphere-based scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2009;89(3):632-41.
 104. Ko HS, Lee S, Lee D, Jho JY. Mechanical properties and bioactivity of poly(Lactic acid) composites containing poly(glycolic acid) fiber and hydroxyapatite particles. *Nanomaterials*. 2021;11(1):1-13.
 105. Morgan EF, Unnikrisnan GU, Hussein AI. Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. Vol. 20, *Annual Review of Biomedical Engineering*. Annual Reviews Inc. 2018; 20: 119-43.
 106. Pérez-Sánchez L, Ortiz de la O MA, González-Alva P, Medina LA, Masuoka-Ito D, Alvarez-Perez MA, et al. In Vivo Study on Bone Response to 3D-Printed Constructs Designed from Microtomographic Images. *J Mater Eng Perform*. 2021;30(7):5005-12.
 107. Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomater*. 2019;84:16-33.

-
-
108. Namjoynik A, Islam MA, Islam M. Evaluating the efficacy of human dental pulp stem cells and scaffold combination for bone regeneration in animal models: a systematic review and meta-analysis. *Stem Cell Res Ther.* 2023;14(1):132.
 109. Sabbagh J, Ghassibe-Sabbagh M, Fayyad-Kazan M, Al-Nemer F, Fahed JC, Berberi A, et al. Differences in osteogenic and odontogenic differentiation potential of DPSCs and SHED. *J Dent.* 2020;101: 103413.
 110. Alksne M, Kalvaityte M, Simoliunas E, Gendviliene I, Barasa P, Rinkunaite I, et al. Dental pulp stem cell-derived extracellular matrix: autologous tool boosting bone regeneration. *Cytotherapy.* 2022;24(6):597-607.
 111. Fujii Y, Hatori A, Chikazu D, Ogasawara T. Application of Dental Pulp Stem Cells for Bone and Neural Tissue Regeneration in Oral and Maxillofacial Region. *Stem Cells International.* Hindawi Limited.2023;(2023):1-11.
 112. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol.* 1990; 143(3):420-30.
 113. Kwon DY, Kwon JS, Park SH, Park JH, Jang SH, Yin XY, et al. A computer-designed scaffold for bone regeneration within cranial defect using human dental pulp stem cells. *Nature Publishing Group.* 2015; (2014):1-16.
 114. Gendviliene I, Simoliunas E, Alksne M, Dibart S, Jasiuniene E, Cicenas V, et al. Effect of extracellular matrix and dental pulp stem cells on bone regeneration with 3D printed PLA/HA composite scaffolds. *Eur Cell Mater.* 2021;41:204-15.
 115. Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: A review. *International Orthopaedics.* 2013;37: 2491-8.
 116. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: A basic physiologic process in wound healing. Vol. 4, *International Journal of Lower Extremity Wounds.* 2005;4: 138-44.
 117. Alksne M, Kalvaityte M, Simoliunas E, Gendviliene I, Barasa P, Rinkunaite I, et al. Dental pulp stem cell-derived extracellular matrix: autologous tool boosting bone regeneration. *Cytotherapy.* 2022;24(6):597-607

