



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Andamios de PLA blancos vs.  
transparentes: Respuesta  
celular *in vitro* e *in vivo***

**TESIS**

Que para obtener el título de

**CIRUJANA DENTISTA**

**P R E S E N T A**

Mariana Nataly Carbajal Casique

**DIRECTORA DE TESIS**

Dra. Janeth Serrano Bello

**ASESORES DE TESIS**

Mtro. Ricardo Gamaliel González Andrade

Dra. Beatriz Hernández Monjaraz



**Ciudad de México, 2024.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## Agradecimientos

El financiamiento fue otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto **PAPIITIN 218223**.

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, Facultad de Odontología, División de Estudios de Posgrado e Investigación bajo la dirección de la Dra. Janeth Serrano Bello y asesoría de la Dra. Beatriz Hernández Monjaraz y Mtro. Ricardo Gamaliel González Andrade.

La colaboración del Laboratorio de Biomateriales Dentales Facultad de Odontología, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Así como, al Instituto de Física de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## Agradecimientos a título personal

Agradezco a la Dra. Janeth Serrano Bello y la Dra. Lucia Pérez Sánchez; por su constante asesoría, apoyo técnico, académico y emocional. Por inspirarme día con día, ser mi guía y ejemplo, no solamente académico sino moral.

Así mismo, agradezco a la Dra. Beatriz Hernández Monjaraz por darme la oportunidad de adentrarme en el mundo de la investigación, desde el primer año de la carrera. La recordaré siempre como una de las mejores docentes en mi formación, así como consejos y apoyo incondicional.

De igual manera, doy gracias a la Mtra. Cecilia Mecalco Herrera por su acompañamiento durante la carrera. Por ejercer con vocación y dedicación la docencia. Su enseñanza que llevaré toda la vida es “La salud es transmisible”.

Agradezco al Dr. Ricardo y la Dra. Janet por sus atenciones y contribución a mi formación como Cirujana Dentista.

Las palabras no serían suficientes para agradecer el apoyo de mi familia que siempre tuvieron la mejor disposición y me motivaban. En especial a mi tía María, que siempre tuvo palabras de aliento y buenos deseos. Las pláticas largas por las tardes y tips sobre como navegar la vida con energía positiva. Eres una de las fuentes más inspiradoras de resiliencia y ética en el trabajo que tengo en mi vida.

Asimismo, valoro demasiado todo el apoyo que Oto me ha dado en cada momento. Su compañía, amor y motivación fueron fundamentales. Me has ayudado en tantas maneras que describir cada una de ellas sería imposible. Deseo que podamos encontrar el éxito acompañados uno del otro.

Aprecio a todos los integrantes del Laboratorio de Bioingeniería de tejidos, por incluirme, su confianza y compartir su conocimiento. Agradezco que me haya acercado a una de las personas más incondicional, leal, y cariñosa mi amiga Eli. Llegaste en un momento muy importante para mí, eres la amiga que no sabía que necesitaba. Nuestra amistad ha experimentado de todo en un corto tiempo, pero aun así quédate por siempre.

A mis amigos que siempre han estado Gaba, Dany y Vianney. A pesar de no vernos tan seguido fueron mis pacientes en momentos de crisis y siempre tuvieron la disposición de ayudar, escuchar y acompañar. Esta etapa que compartimos sea la nueva de muchísimas más, amigos.

Agradezco a todos los amigos que hice durante la carrera que hicieron que esta experiencia universitaria fuera memorable. Gracias a Jorge, Noé, Shayna, Fabiola, Carlos, Said, Paola, Adal, Itzel, Andrea, Adrián, Alberto, Yariz, Nancy, Belén, y a todo el grupo.

Por supuesto, me siento agradecida con muchas personas que no mencioné por nombre, pero que estuvieron en esta etapa, gracias por ser parte de mí formación.

Finalmente, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por permitirme conocer y aprender dentro de sus aulas.

## Dedicatoria

### *A mi padre.*

Nunca podré agradecerte todo lo que has hecho por mí. Siempre estuviste en todo momento brindando consejos y palabras de aliento, mientras sostenías mi mano.

Has sido mi mejor maestro, maestro de fortaleza, resiliencia y dedicación.

No estaría cumpliendo mis metas sin ti. Estoy orgullosa de lo que hemos logrado porque este triunfo es tanto mío como tuyo.

Te amo profundamente.

### *A mi madre.*

Por siempre apoyarme y estar conmigo. Desde siempre has inculcado valores que me han hecho la persona que soy.

Te amo por siempre.

### *A mis hermanas.*

Gracias por acompañarme siempre, siendo mis primeros pacientes, ayudándome a estudiar, pero sobre todo por el amor y apoyo.

Ustedes, Cris y Meli son mi motivación más grande. Desde siempre he tenido las mejores e incondicionales de amigas con ustedes a mi lado.

Deseo que este sea el primer logro de varios que compartiremos entre todas.

Las amo infinitamente.

### *A mis abuelos.*

Su apoyo siempre ha sido desbordante. Todo lo que hacen por mí y mis hermanas se los agradezco profundamente.

Los llevo siempre en mi corazón.



# Índice

Abreviaturas.....	VIII
I. Resumen.....	1
II. Abstract .....	2
IV. Antecedentes.....	4
IV.1 Medicina regenerativa .....	4
IV.2 Biomateriales.....	6
IV.3 Regeneración de tejido óseo .....	8
IV.4 Alternativas en bioingeniería de tejidos.....	12
IV.5 El políácido láctico.....	20
V. Planteamiento del problema.....	25
VI. Objetivos .....	26
VI.1 Objetivo general .....	26
VI.2 Objetivo específicos .....	26
VII. Justificación .....	27
VIII. Hipótesis .....	27
IX. Material y método.....	27
IX.1 Tipo de estudio .....	27
IX.2 Universo de estudio .....	27
IX.3 Criterios de selección.....	27
IX.4 Variables.....	29
IX.5 Técnica .....	30
X. Resultados .....	35
X.1 Descripción superficial del andamio .....	35
X.2 Tamaño de poro .....	36
X.3 Porcentaje de Porosidad.....	37
X.4 Pruebas mecánicas.....	38
X.5 Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	39
X.5.1 Blanco.....	39
X.5.2 Transparente.....	40
X.6 Ensayo de viabilidad celular (WST-1).....	41
X.7 Ensayo de fosfatasa alcalina .....	42

<b>X.8 Ensayo de Alizarina Roja</b> .....	<b>43</b>
<i>X.8.1 7 días</i> .....	43
<i>IX.8.2 14 días</i> .....	44
<b>X.9 Imágenes de microscopía electrónica de barrido</b> .....	<b>45</b>
<i>X.9.1 Transparente</i> .....	45
<i>X.9.2 Blanco</i> .....	46
<b>X.10 Histología</b> .....	<b>47</b>
<i>X.10.1 7 días</i> .....	47
<i>X.10.2 21 días</i> .....	48
<i>X.10.3 41 días</i> .....	49
<b>XI. Discusión</b> .....	<b>50</b>
<b>XII. Conclusión</b> .....	<b>54</b>
<b>XIII. Limitaciones y Perspectivas</b> .....	<b>54</b>
<b>XIV. Referencias</b> .....	<b>55</b>

## Abreviaturas

ABS	Absorbancia
ALP	Fosfatasa alcalina
ARS	Alizarina Roja
DMEM/F-12	Medio Eagle modificado de Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
FDM	Modelado por deposición fundida
hFOB	Osteoblastos humanos fetales
IC	Inflamación crónica
ISO	Organización
MEB	Microscopio electrónico de barrido
MEC	Matriz extracelular
PLA	Poliácido láctico
L-PLA	Levorrotatoria ácido láctico
D-PLA	Dextrorrotatorio ácido láctico
SFB	Suero fetal bovino
WST-1	Reactivo de proliferación celular

## I. Resumen

Una de las estrategias de la ingeniería tisular es la impresión de andamios 3D para la regeneración de tejido óseo. Dentro de esta técnica uno de los biomateriales más utilizados es el PLA. A pesar de reportarse una diferencia de propiedades según el color, existe poca información y se utiliza indistintamente. Por lo cual, el presente trabajo intenta dilucidar si existe diferencia en el PLA con o sin color. Evaluar la estructura superficial y respuesta celular de andamios impresos en 3D, blancos y transparentes. Se imprimieron 50 andamios con PLA blanco y transparente respectivamente. Posteriormente, se llevaron a cabo dos fases: *in vitro* e *in vivo*. En la primera fase se estudió la superficie estructural, tamaño de poro, porcentaje de porosidad y pruebas mecánicas de compresión. Así como, viabilidad celular, actividad de la enzima fosfatasa alcalina y alizarina roja. En la fase *in vivo*, se evaluó su respuesta inflamatoria por medio de muestras histológicas. La estructura superficial del andamio blanco se observó con mayor definición y fidelidad al diseño original en comparación al transparente. Por ende, el porcentaje de porosidad en el andamio blanco fue de 67% mientras que el transparente obtuvo 53%. Finalmente, se observó la aceptación de los andamios; sin embargo, las muestras histológicas revelan mayor presencia de células gigantes de tipo cuerpo extraño en el andamio transparente. El pigmento del poliláctico favorece procesos como el modelado por deposición fundido por su tensión superficial puede mantener su forma al ser enfriado y por consecuencia tener mejor estructura superficial.

## II. Abstract

One of the strategies used in tissue engineering is printing 3D scaffolds for regenerating bone tissue. PLA is by far the most used biopolymer in FDM. Even though there are few studies proving that colored or lack thereof in PLA changes properties, little importance is given and used indistinctly. Therefore, it is important to clarify if indeed properties change and shed light on this topic. Evaluate the superficial structure and cellular response of scaffolds printed in 3D with white and translucent PLA. Fifty scaffolds were printed in white and translucent PLA. In the *in vitro* stage the superficial structure, pore size, porosity, and mechanical properties like compression. As well as cell assays like WST-1, ALP, and ARS in both scaffolds. The *in vivo* stage used *Wistar* male rats that were put under to intervene surgically and then obtain histology samples to the inflammation response. The superficial structure of the scaffold printed with white PLA presented with better definition and fidelity to the original design compared with the translucent. Consequently, the White scaffold had 67% porosity and a wider range of big pores whereas the translucent only had 53% porosity and smaller pore size range. Finally, it was proven that HFOB cells had good acceptance to both scaffolds, even though in the histology samples the translucent showed more presence of foreign body giant cells. The pigment in polylactic acid favors processes like Model fused deposition because superficial tension helps it maintain the shape when it is cooling, leading it to have better superficial structure.

### III. Introducción

La Ingeniería tisular es un campo prometedor, su objetivo principal está orientado al reemplazo o regeneración de tejidos dañados o perdidos por múltiples factores, a través del desarrollo de andamios que imiten la matriz extracelular, restaurando las funciones biológicas mediante la combinación de principios de ingeniería y ciencias biológicas.

La ingeniería de tejido basada en andamios es prometedora para la rehabilitación de defectos óseos, siempre y cuando se cumplan las características idóneas: biodegradable, bioabsorbible, bioactivo y biocompatible.

Actualmente, se han propuesto materiales funcionales recubiertos de metal, así como polímeros biodegradables como la siguiente generación de medicina ortopédica para la ingeniería de tejidos. Incluso se ha propuesto combinarlo con materiales osteo inductivos como hidroxapatita y tricálcico de fosfato cerámico.

Una estrategia para la fabricación de andamios es la impresión 3D, con biomateriales como poliácido láctico (PLA) que ha sido utilizado en el área médica y en la ingeniería de tejidos óseos. A pesar de que el modelado por deposición fundida es de las técnicas más utilizadas, no está completamente industrializada. Puesto que, el proceso implica muchos parámetros específicos, y la falta de estandarización de estos, así como de los materiales expuestos por casas comerciales presenta un reto. El PLA blanco o transparente se usa para la síntesis de andamios, sin embargo, actualmente existe poca literatura científica que especifique si el color de dicho biomaterial influye en la respuesta estructural y biológica de los andamios.

## IV. Antecedentes

### IV.1 Medicina regenerativa

La medicina regenerativa es una rama de la medicina la cual tiene como objetivo principal reemplazar, fabricar o regenerar células humanas, tejidos u órganos para restaurar la estructura y su funcionamiento <sup>1</sup>.

Para lograr estos fines se pueden utilizar tres técnicas: la terapia celular, la regeneración tisular guiada y la ingeniería tisular. La terapia celular en un sentido amplio incluye cualquier tipo de tratamiento que utiliza células como agente terapéutico. Contempla la implantación de células o del material celular en el tejido dañado para lograr la reparación. El material celular puede ser generado:

- Por medio de cultivo *ex vivo*, que puede proceder del propio paciente (células auto génicas).
- Por medio de un donante de la misma especie (células alogénicas)
- En última instancia pueden ser a partir de una distinta especie (células xenogénicas)

Algunos ejemplos de este procedimiento con gran éxito en la actualidad son las transfusiones sanguíneas y el trasplante de médula ósea. La regeneración tisular guiada se refiere a regenerar el tejido in situ mediante la estimulación del crecimiento de las células del propio tejido dañado mediante biomateriales, fármacos, factores de crecimiento o terapia génica <sup>2</sup>.

La ingeniería tisular es una rama de la medicina regenerativa cuyos objetivos principales están orientados al reemplazo o regeneración bio artificial de tejidos, así como órganos propios del cuerpo que llegaron a ser dañados por múltiples factores: quemaduras, malformación congénita, o incluso alguna enfermedad adquirida. Por lo cual, se encarga de desarrollar distintos materiales que reemplacen la matriz

extracelular natural para que las células se puedan formar a partir de ello para cumplir su apropiada estructura y función <sup>2,3</sup>.

Es importante proveer el ambiente y condiciones para lograr una adecuada regulación celular y una entrega de factores bioactivos. La naturaleza nos deja en claro que este objetivo es alcanzable debido a que desde el nacimiento se ha tenido éxito con procesos de curación y reparación de fracturas de forma habitual <sup>3</sup>.

La ingeniería de tejidos hace énfasis en la terapia basada en células, enfocándose en métodos de recolección y expansión *in vitro* de los tejidos vivos. El diseño de biomateriales y andamios o scaffolds brindan un soporte extracelular artificial, que reemplaza a la natural y provee un espacio tridimensional, para que las células puedan formar el nuevo tejido con su apropiada estructura y función. En el ámbito médico ha sido importante su aportación ya que a diferencia de la cirugía reconstructiva que se encarga de reparar el tejido, la Ingeniería tisular tiene como objetivo la regeneración de este <sup>4</sup>.

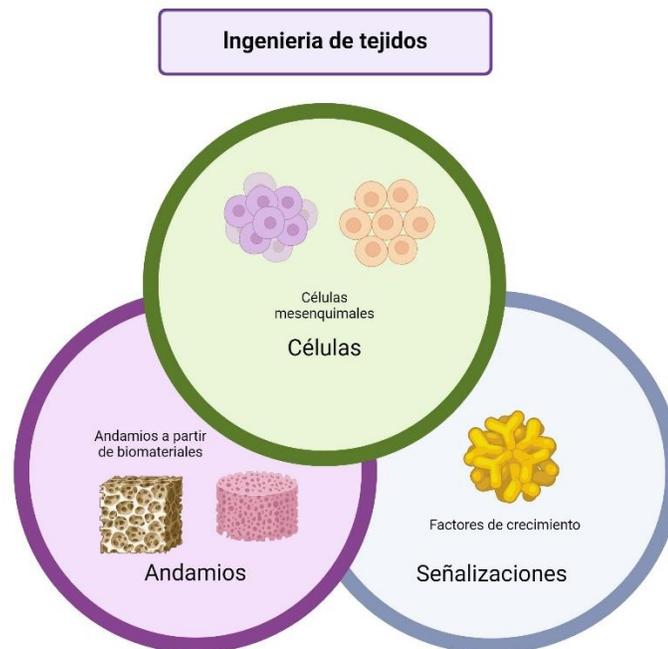


Figura IV.1. Triada de la Ingeniería de Tejidos. Modificada de George K. B. Sándor<sup>4</sup>.

## IV.2 Biomateriales

En la ingeniería tisular, la generación de tejidos artificiales de origen mesenquimal como el hueso, cartílago, la dermis o la lámina propia de la mucosa oral requiere un material que actúe como sustituto de la matriz extracelular del tejido nativo. Para ello se utilizan diferentes biomateriales <sup>4</sup>.

Un biomaterial se define como productos empleados para reproducir la función de tejidos vivos en sistemas biológicos de forma segura, mecánicamente funcional y aceptable fisiológicamente, que son temporales o permanentes implantados en el cuerpo y que tratan de restaurar el defecto existente y, en algunos casos regenerar tejidos <sup>5</sup>.

En la ingeniería tisular, los biomateriales deben favorecer la función biológica, así como la mecánica de las células ya que actúan como una matriz extracelular artificial. Estos materiales deben de cubrir ciertos requerimientos como el darles a las células espacio en tercera dimensión para conformar nuevos tejidos con la estructura y función apropiada. Las células que se emplean por lo regular suelen ser de anclaje y pueden morir si no hay una base para la adhesión celular ya que deben actuar como una matriz extracelular artificial <sup>4,6</sup>.

Para el uso de los biomateriales en tejido vivo se debe cumplir ciertos requisitos generales que se engloban en el concepto de biocompatibilidad, implica que el material empleado no cause daño al cuerpo, pero además de los tejidos que lo rodean. Se dice que el material no es biocompatible cuando sea tóxico al organismo y produzca la muerte de los tejidos que rodean al material. Es importante considerar su estabilidad tanto a corto como a largo plazo, así como el mantenimiento de sus propiedades y estructura químico-física en el entorno biológico durante el tiempo que permanezca en el organismo <sup>5</sup>.

Además, deben poseer propiedades mecánicas y químicas específicas para garantizar la función para la cual fueron diseñados. Esta viabilidad funcional es crítica y está relacionada con la capacidad del material para desempeñar su papel en una aplicación concreta, garantizando a largo plazo la función del órgano o tejido donde se implanta <sup>7</sup>.

Un biomaterial nuevo debe ser sometido a pruebas clínicas: simulaciones biomecánicas, modelos *in vitro*, ensayos toxicológicos y de biocompatibilidad, e implantación en modelos animales <sup>6,8</sup>.

Los requisitos que debe cumplir un biomaterial son:

1. Ser biocompatible, aceptado por el organismo receptor, y no provocar que éste desarrolle mecanismos de rechazo ante la presencia del biomaterial.
2. No ser tóxico, ni cancerígeno.
3. Ser químicamente estable, o biodegradable en productos no tóxicos, al menos durante el tiempo programado, ya que hay biomateriales biodegradables y permanentes.
4. Resistencia y propiedades mecánicas, características superficiales, el tiempo de fatiga y el peso sean los adecuados.
5. Diseño, tamaño y forma del implante deben ser adecuados.

A todo ello debe añadirse el ser costeable para poder ser reproducible y su procesamiento fácil para su producción en gran escala <sup>6,7</sup>.

Los biomateriales se pueden clasificar por origen; sintéticos y naturales que a su vez se derivan en diferentes clasificaciones. En esta investigación se estudiaron los sintéticos <sup>9</sup>.

Generalmente los materiales poliméricos proveen más control en cuanto a características de andamios como tamaño de poro, porosidad, solubilidad, biocompatibilidad, reacciones enzimáticas y respuestas alérgicas <sup>9</sup>.

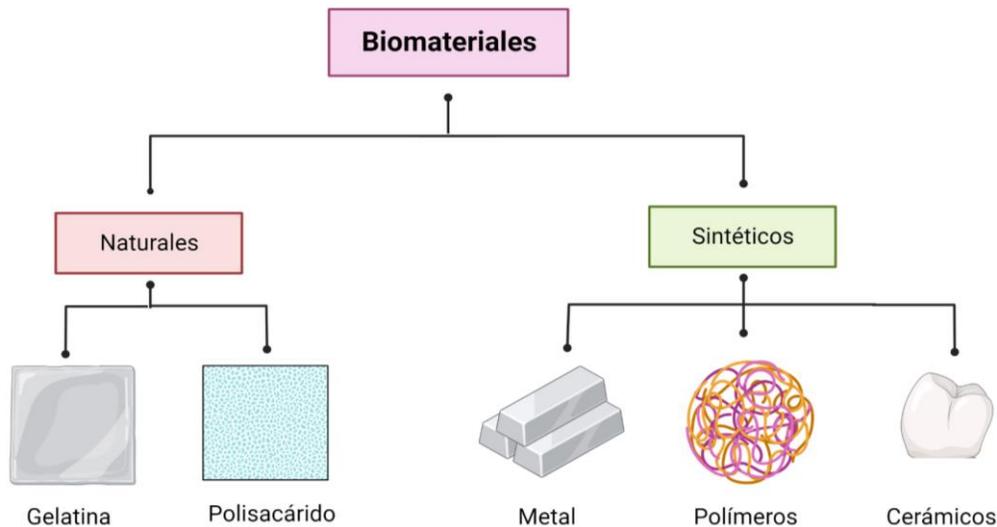


Figura IV. 2. Clasificación de biomateriales por origen.

### IV.3 Regeneración de tejido óseo

La rehabilitación de los defectos óseos ha cobrado gran relevancia en los últimos años, dado el número de daños en articulaciones y fracturas óseas que se producen por distintos motivos. En función del tipo de lesión, en los tratamientos se puede utilizar autoinjertos, aloinjertos (cuyo éxito dependerá de la forma de almacenamiento del material del donador, de los problemas de infección y de la reacción inmune) y los xenoimplantes, a los que además se pueden sumar los problemas derivados del rechazo inmune a un tejido de otra especie <sup>10</sup>.

### *IV.3.1 Injerto Autólogo*

El hueso autólogo ha sido aplicado como material para el aumento óseo con muy buenos resultados. Presenta propiedades ideales del injerto; osteogénico, osteo conductor y osteo inductor; además de su rápida cicatrización, incomparable con ningún otro material, convirtiéndose en el “Golden standard” para la cirugía ósea reconstructiva <sup>9,10</sup>.

Un aspecto importante de considerar es el origen embrionario del injerto, ya que sugiere que la tasa de reabsorción del injerto depende de su origen embriológico, los de origen membranoso (injerto de calota o mandíbula) no se reabsorben tanto como los de origen endocondral (injertos de cresta iliaca). Los injertos óseos esponjosos se reabsorben más rápido que los injertos corticales, lo que indica que la reabsorción depende principalmente de la estructura y microarquitectura del injerto. Los injertos óseos con o sin utilización de biomateriales constituyen una alternativa para la rehabilitación de defectos óseos <sup>11</sup>.

### *IV.3.2 Aloinjertos*

Los aloinjertos provienen del tejido óseo de individuos de la misma especie; presentan propiedades osteo conductoras, que estimulan la formación de hueso. Ejemplos son el hueso fresco congelado, el hueso deshidratado congelado y hueso desmineralizado liofilizado <sup>12</sup>.

Los bancos de hueso permiten disponer de una cantidad limitada de hueso y sin la morbilidad de su extracción. Inevitablemente, se plantea el riesgo de transmisión de enfermedades para los receptores, por lo que el desafío de mantener los injertos seguros resulta esencial y una premisa fundamental, consiste en contar con un adecuado y fiable banco de huesos y tejidos <sup>12,13</sup>.

Los aloinjertos tienen ciertas ventajas frente al autólogo, evitando la morbilidad del sitio donante y el compromiso de tejidos sanos del huésped; disponibilidad inmediata, posibilidad de obtener tamaños, formas y cantidad apropiada, así como almacenamiento durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, no se debe perder de vista sus desventajas tales la potencial transmisión de enfermedad y respuesta antigénica. <sup>11</sup>

#### *IV.3.3 Xenoinjertos*

El xenoinjerto es un sustituto óseo procedente de especies distintas al receptor, bien de animales o minerales semejantes al hueso, derivados de corales o algas. Estos son biocompatibles y presentan propiedades osteo conductoras, soportando el crecimiento vascular, la migración y diferenciación celular y la consecuente formación de hueso siempre en medio osteogénico propicio. Con el tiempo se observa que los espacios interparticulares se rellenan con hueso nuevo <sup>13</sup>.

Los xenoinjertos presentan una fácil disponibilidad y están enteramente libres de peligro de transmisión de enfermedades, siempre y cuando se cumplan los protocolos de procesamiento de esterilización. Los xenoinjertos más empleados en la vida cotidiana son los derivados de hueso bovino, porcino y equino <sup>12</sup>.

#### *IV.3.4 Aloplásticos*

Los injertos aloplásticos para tejido óseo son materiales de naturaleza no orgánica, sintéticos y al igual que los xenoinjertos osteo conductores. Existe una amplia variedad de materiales, bio cerámicas, y cristales bioactivos. Existen diferencias estructurales entre ellos, también en su composición y en sus propiedades mecánicas, así como biológicas <sup>14</sup>.

El hueso está compuesto por una fase mineral (69%, hidroxapatita, fosfato cálcico, carbonato, etc.) una fase orgánica (22% de la cual 90% es colágeno y el resto componentes celulares) y 9% agua. Aunque el mejor sustitutivo óseo es el hueso

mismo, también se puede recubrir la zona del defecto con dispositivos fabricados con biomateriales metálicos y poliméricos o combinaciones de ellos; todo depende de la lesión <sup>12</sup>.

A pesar de las limitaciones para algunas de las aplicaciones se han desarrollado, y continúan en estudio, algunos biomateriales cerámicos potencialmente sustitutos de óseos, como los cementos fosfato cálcicos. Una terapia alternativa que ha recobrado importancia en investigaciones recientes ha sido el reemplazamiento protésico constituido por la regeneración biológica con restauración de la mineralización. En este caso se utilizan osteoblastos que crecen sobre andamios o hidrogeles de polisacáridos que pueden incluir factores de crecimiento y diferenciación <sup>11,15</sup>.

Los biomateriales cumplen como injerto. Estos injertos podrán ser de diferentes tipos, tales como, la osteo inducción consiste en la obtención de células de tipo mesenquimal que pueden diferenciarse en osteoblastos y condroblastos. La osteo inducción está mediada por factores del injerto y es escasa en injertos mineralizados (su máxima capacidad osteoinductora proviene de células que porta) y muy importante en los no mineralizados. La matriz ósea contiene diversas proteínas morfogenéticas, factor transformante B, factores similares a la insulina I y II, factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, interleucinas, factores estimuladores de colonias de granulocitos y de granulocitos- macrófagos, etc. los cuales inducen la diferenciación de las células mesenquimales en osteoblastos. La exactitud de asiento del injerto osteo conductor es esencial para tener éxito, ya que este depende del reclutamiento de las células del huésped <sup>16,17</sup>.

Por ejemplo, en un lecho muy fibrótico e irradiado previamente la formación de hueso alrededor del injerto dependerá casi exclusivamente de la capacidad osteogénica del mismo y no de su capacidad osteoinductora. Sin embargo, la osteo inducción no es una propiedad exclusiva de la matriz ósea y sus proteínas, puesto

que recientemente ha sido utilizada para aloinjertos óseos esterilizados y conservados y para diversos biomateriales <sup>16,17</sup>.

La osteo conducción es el proceso tridimensional de crecimiento de brotes vasculares, tejido perivascular y células osteo progenitoras desde el lecho del receptor al interior del injerto. La osteo conducción puede ocurrir por una neoformación ósea activa por osteo inducción o puede suceder pasivamente sin la participación del propio injerto, como sucede en la mayoría de los aloinjertos corticales <sup>18</sup>.

La osteo conducción no es un proceso aleatorio y sigue un patrón espacial ordenado y predecible determinado por la estructura del injerto, el aporte vascular desde los tejidos colindantes, el ambiente mecánico y la presencia de otros biomateriales <sup>19</sup>.

#### **IV.4 Alternativas en bioingeniería de tejidos**

##### *IV.4.1 Andamios o constructos 3D*

El campo de estudio de la ingeniería tisular es multidisciplinario que en los últimos años ha cobrado relevancia en medicina clínica, ingeniería mecánica, especialistas en biomateriales, genética y otras disciplinas dentro de las ciencias médicas y de salud como ingeniería. Su enfoque de esta disciplina se ha enfocado intensamente en el uso de andamio porosos 3D para proveer el ambiente apropiado para la regeneración de tejidos y órganos <sup>20</sup>.

Los andamios actúan esencialmente como soporte para la formación de tejido y normalmente se siembran con células y ocasionalmente, factores de crecimiento, o se someten a estímulos biofísicos en forma de biorreactor. Dispositivo o sistema que aplica diferentes tipos de estímulos mecánicos o químicos a las células <sup>19,20</sup>.

Estos andamios pueden ser tanto cultivados *in vitro* para sintetizar tejidos que posteriormente serán implantados al sitio dañado, o directamente al sitio dañado, utilizando el sistema del cuerpo, donde la regeneración de tejidos y órganos es inducida *in vivo*. La combinación del andamio, células y señalizaciones son conocidas como la tríada de ingeniería tisular <sup>21</sup>.

#### *IV.4.2 Tipos de andamios*

Estos andamios se podrán clasificar en dos tipos; celulares y acelulares. Los andamios celulares son constructos porosos a los que se le agregan células o factores de crecimiento que actúan como guía de formación de tejido. Los andamios acelulares son fabricados para producir matrices ricas en colágeno por medio de interacciones mecánicas y químicas <sup>20,21</sup>.

#### *IV.4.3 Características de los andamios en la ingeniería de tejidos*

Numerosos andamios han sido fabricados a partir de una variedad de biomateriales y fabricados usando diversas técnicas que han sido utilizadas para la regeneración de distintos tejidos y órganos del cuerpo. Sin importar el tipo de tejido, es importante considerar ciertos requisitos al momento de diseñar o determinar si el andamio es ideal <sup>15,20</sup>.

- Biocompatibilidad

El primer criterio para cualquier andamio para la ingeniería de tejido es que debe ser biocompatible; células se deben adherir, cumplir con la función, y migrar a la superficie y eventualmente a través del andamio y proliferar y así crear una nueva matriz. Después de la implantación, el andamio no puede causar una reacción inflamatoria severa que pueda reducir la regeneración y reparación, así como generar un rechazo por cuerpo extraño <sup>15</sup>.

- Biodegradable

El objetivo de la ingeniería tisular es permitir que las células propias del cuerpo eventualmente reemplacen el andamio implantado. Los andamios no están destinados a ser permanentes, por lo tanto, este debe ser biodegradable, y así, permitir producir su propia matriz extracelular <sup>13,14</sup>.

Los andamios deben ser fabricados con biomateriales para que así su degradación sea no- tóxica y capaz de ser eliminada por el cuerpo sin interferir con otros órganos. La implementación de diversas estrategias en la ingeniería tisular de manera recurrente hace que la inmunología cobre un rol prominente dentro del área de la investigación <sup>13</sup>.

- Propiedades mecánicas

Idealmente, el andamio debe tener propiedades mecánicas de acuerdo con la región anatómica en la que será implantado. Desde una perspectiva práctica el andamio debe ser lo suficientemente resistente para poder ser manipulado en el procedimiento de implantación. Si bien esto es importante en todos los tejidos, en la ortopedia y cardiología presenta un gran reto. Manufacturar andamios con adecuadas propiedades mecánicas es en especial difícil cuando se trata cartílago o hueso ya que estos tejidos deben poseer integridad mecánica desde el momento que es implantado hasta que complete la regeneración. La edad tendrá gran influencia cuando se trata de regenerar; por ejemplo, en individuos jóvenes regularmente una fractura se recupera en seis semanas y tarda aproximadamente 1 año para tener integridad mecánica completa, mientras que, en un paciente anciano el proceso de reparación se ve aumentado <sup>15</sup>.

Dentro del campo de estudio de la ingeniería tisular se les ha dado gran importancia a las propiedades mecánicas al diseñar un andamio con aplicación ortopédica. Sin embargo, se puede refutar, que gran interés se ha dado a crear andamios que asimilen las propiedades mecánicas del hueso y cartílago. diversos materiales han

sido propuestos por poseer buenas propiedades mecánicas, sin embargo, se ha visto deficiente en cuanto a porosidad, por lo que materiales que han demostrado tener un potencial intrínco han fracasado al ser implantados sin vida debido a su capacidad insuficiente de vascularización. Por lo tanto, para el éxito de un andamio será clave encontrar el equilibrio entre propiedades mecánicas y porosidad que permita la infiltración celular y vascularización <sup>13,14</sup>.

- Diseño del andamio

El diseño del andamio será crítico para la regeneración de cualquier tejido. Los andamios deben poseer una porosidad alta, así como intercomunicación del andamio al tejido adyacente para asegurar la migración celular y de nutrientes para la matriz extracelular (MEC) formada por estas células <sup>13,15</sup>.

La intercomunicación del andamio es requerida para que permita la eliminación de residuos del andamio, y la degradación de este debe ser posible sin interferir con otros órganos y tejidos rodeando el defecto. La degradación del núcleo derivado de la falta de vascularización y eliminación de desechos del centro del andamio es de preocupación para los investigadores. El tamaño de poro es clave, puesto que las células interactúan principalmente con los andamios a través de grupos químicos en la superficie. Los andamios sintetizados de material extracelular natural poseen enlaces <sup>16</sup>.

- Tecnología de manufactura

Debe ser considerado que sea viable desde un punto de vista clínico y comercial, para lograr ser reproducible <sup>17</sup>.

Existen diversas técnicas de fabricación de andamios, sin embargo, la de interés para este estudio es la impresión 3D, la cual tiene como antecedente como gran potencial en producción de andamios funcionales. Cabe mencionar, que los

andamios 3D son diseñados con estructuras óseas anatómicamente precisas y que coinciden con el tamaño y la forma del defecto óseo <sup>17,18</sup>.

#### *IV.4.4 Impresión 3D*

En los últimos años ha cobrado gran importancia la manufactura aditiva o bien impresión 3D puesto que permite personalizar tejidos y órganos, además de ser capaz de promover el crecimiento celular, disminuyendo así la posibilidad de rechazo al órgano o tejido trasplantado <sup>19</sup>.

La combinación de disciplinas ha generado avance para la medicina actual, debido a que como objetivo tiene corregir defectos en distintas partes del cuerpo como: hueso, cartílago y diafragma, desarrollar sustitutos de córnea y fabricar estructuras cerebrales, puesto que la impresión permite que se empleen materiales biodegradables, a los cuales se le pueden añadir factores de crecimiento o células, comúnmente los más utilizados son los biopolímeros <sup>20,21</sup>.

Sin lugar a duda la impresión 3D ha transformado el área de la ingeniería de diseño puesto que permite desarrollar diversos elementos que serían difícilmente fabricados mediante otras técnicas. Esta tecnología en auge nace por la necesidad de adaptación, flexibilidad, rapidez y costos accesibles para su fabricación, así como la preocupante escasez creciente de donadores. Es por esto por lo que en los últimos años ha ganado gran versatilidad y aplicaciones en diversos campos en especial el área de la salud, por consecuencia es de gran interés para desarrollar modelos de aprendizaje, didácticos, prototipos personalizados entre otros <sup>19,20,21</sup>.

La impresión 3D se define como “el proceso de creación de objetos mediante el depósito de capas de material unas sobre otras”. Esta tecnología es valiosa porque permite mejorar la interacción del andamio y del huésped <sup>22</sup>.

Existen distintos métodos de fabricación de andamios en tercera dimensión (3D), como electro hilado, fundición con solvente, formación de espuma con gas y separación de fases <sup>23</sup>.

#### IV.4.5 Electro hilado

Este método se utiliza para sintetizar andamios que imiten la matriz extracelular nativa, actuando como un entorno natural para las células durante la regeneración debido a que las fibras son de tamaño de micras y nano. Esta técnica se fundamenta en el bombeo de una solución del polímero a través de una punta de aguja que se coloca a una distancia determinada de un colector conectado a tierra o con carga opuesta. La fuerza electrostática dentro de la gota supera la tensión superficial, cuando se aplica un voltaje a la punta de la aguja, dando pauta a la expulsión de líquido de la aguja. El andamio que resulta de esta técnica es una matriz de fibra no tejida con geometría dictada por el colector y la configuración de electro hilado <sup>21,25</sup>.

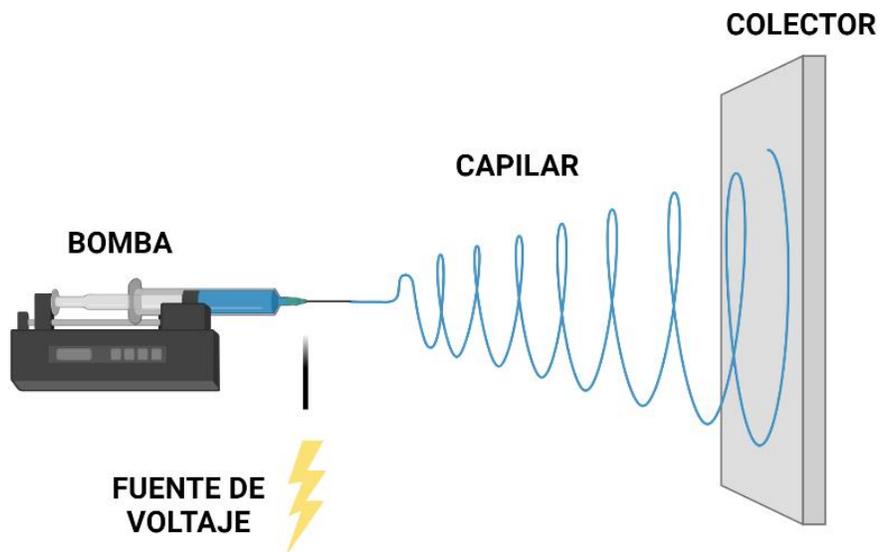


Figura IV. 3. Técnica de electro hilado. Se observa el fundamento de la técnica para la formación de un andamio.

#### *II.4.6 Fundición de solvente*

Esta técnica usa una solución de polímero que se disuelve en un solvente con partículas de sal distribuidas uniformemente de un tamaño determinado. Después de que el solvente se evapora deja atrás una matriz con partículas de sal, la cual, da como resultado en una matriz 3D porosa que puede ser utilizada para sembrar células. Cuando se emplee esta técnica el tamaño de poro estará en función del diámetro de las partículas de sal <sup>23,24</sup>.

#### *II.4.7 Espuma con gas*

Este método consiste en utilizar un andamio polímero, saturado con un agente espumante tal como el dióxido de carbono, nitrógeno o agua a altas presiones. El fundamento es disminuir la presión del agente espumante, lo que ocasiona la solubilidad del gas en el polímero, provocando burbujas de gas que crecen sobre el polímero, como resultado de la inestabilidad termodinámica. El tamaño de poro empleando esta técnica varía entre 100 a 500  $\mu\text{m}$  <sup>25</sup>.

#### *IV.4.8 Separación de fase inducida térmicamente*

Esta técnica se fundamenta en crear andamios poros interconectados, por la disminución de la temperatura polímero/disolvente a través de la temperatura crítica superior a la del disolvente. El proceso consiste en una solución del polímero, ya sea sintético o natural, se enfría por debajo del punto de congelación; lo que lleva a la solidificación de las moléculas del disolvente, obligando al polímero a agregarse en los espacios intersticiales del andamio. Se evapora el disolvente por liofilización, dejando una estructura polimérica con poros intercomunicados que son útiles para sembrar células. El tamaño de poro de esta técnica estará en función del régimen de congelación, la concentración del polímero, el tamaño de los cristales de hielo y el pH de la solución <sup>25,26,27</sup>.

#### IV.4.9 Modelado por deposición fundida (FDM)

La impresión 3D FDM es un proceso de impresión 3D por extrusión de material. Un carrete alimenta filamento termoplástico a través de un extrusor que calienta, funde y extruye el plástico a través de una boquilla fina. Las impresoras 3D de FDM usan una amplia gama de termoplásticos <sup>27,28</sup>.

Esta técnica consiste como su nombre lo dice en depositar el material termoplástico en una consistencia fundida, extruyendo el material en capas delgadas en una superficie plana, construyendo el modelo tridimensional capa por capa. Capaz de replicar geometrías complejas, debido a que el termoplástico no puede sostenerse inmediatamente cuando se deposita por su temperatura. La resolución de los constructos está limitada por el diámetro de la boquilla y materiales (termoplásticos sintéticos, compuestos con cerámicos y metales) <sup>26,28</sup>.

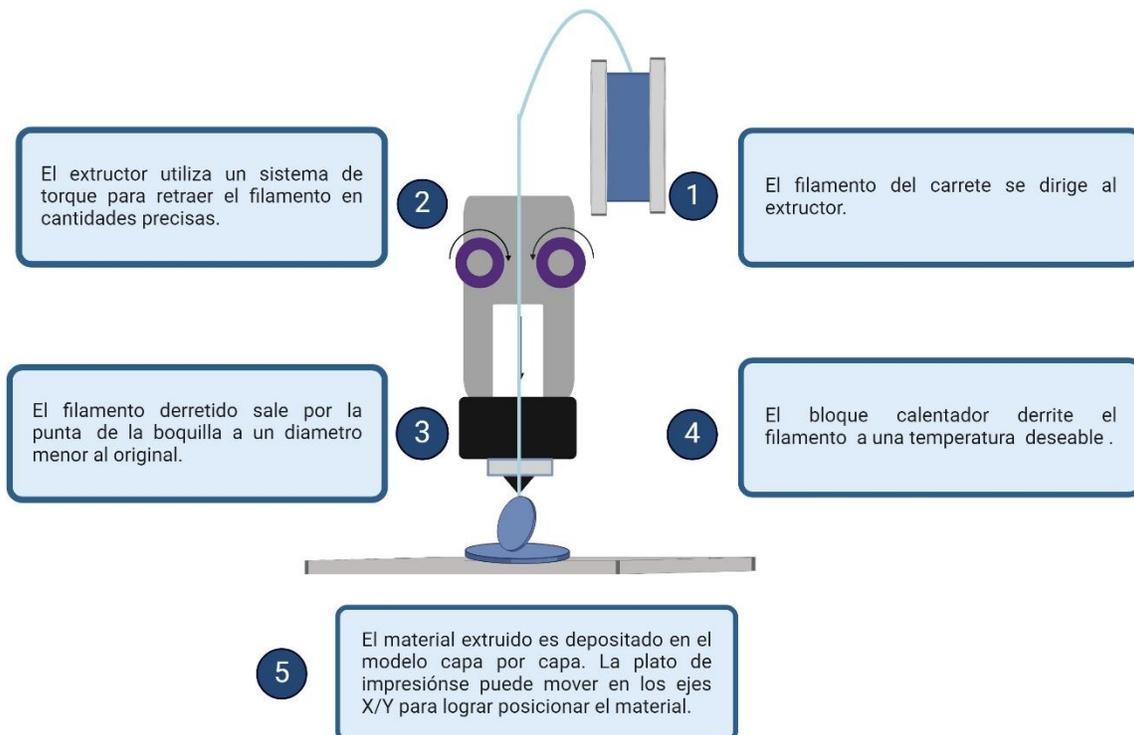


Figura IV. 4. Técnica FDM. Se observa el proceso de impresión por medio de una serie

de pasos hasta la obtención de un constructo 3D.

La aplicación de esta técnica se enfoca principalmente en tejido musculoesquelético puesto que los materiales son biocompatibles con el hueso y tejido muscular denso. La FDM es ideal para piezas de demostración, planificación quirúrgica, debido a la facilidad y velocidad de impresión de muchos modelos u objetos de gran formato. Una ventaja importante de esta técnica es económica y rápida comparada con otras <sup>29,30</sup>.

A pesar de ser una de las técnicas más utilizadas, no está completamente industrializada. Debido a que, el proceso conlleva una gran cantidad de parámetros específicos, esta falta de estandarización hace difícil que sea reproducible en masa sin perder especificaciones de la impresión <sup>29,30,31</sup>.

Un aspecto importante en la fabricación de andamios es el tipo de material que se utiliza, a continuación, se describe uno de ellos, debido a su importancia biomédica.

#### **IV.5 El políácido láctico**

A lo largo de la historia, la petroquímica ha desarrollado diversos polímeros que han beneficiado a la humanidad, pero perjudicado a los ecosistemas. La preocupación creciente por el impacto ambiental de los polímeros ha traído consigo el interés y compromiso de crear métodos alternativos; generando investigaciones para obtener polímeros biodegradables como alternativa a los convencionales (no degradables) como el polietileno y poliestireno. El políácido láctico (PLA) es un polímero sintético totalmente biodegradable disponible comercialmente desde 1990 <sup>28,32</sup>.

El ácido láctico es el compuesto base para producir PLA. El ácido láctico existe en dos isómeros, levorrotatoria ácido láctico L o S (+) y dextrorrotatorio ácido láctico D o R (-). El ácido láctico dextrorrotatorio es obtenido del músculo animal mientras que el ácido láctico levorrotatorio es el obtenido por medio de fermentación <sup>33,34</sup>.

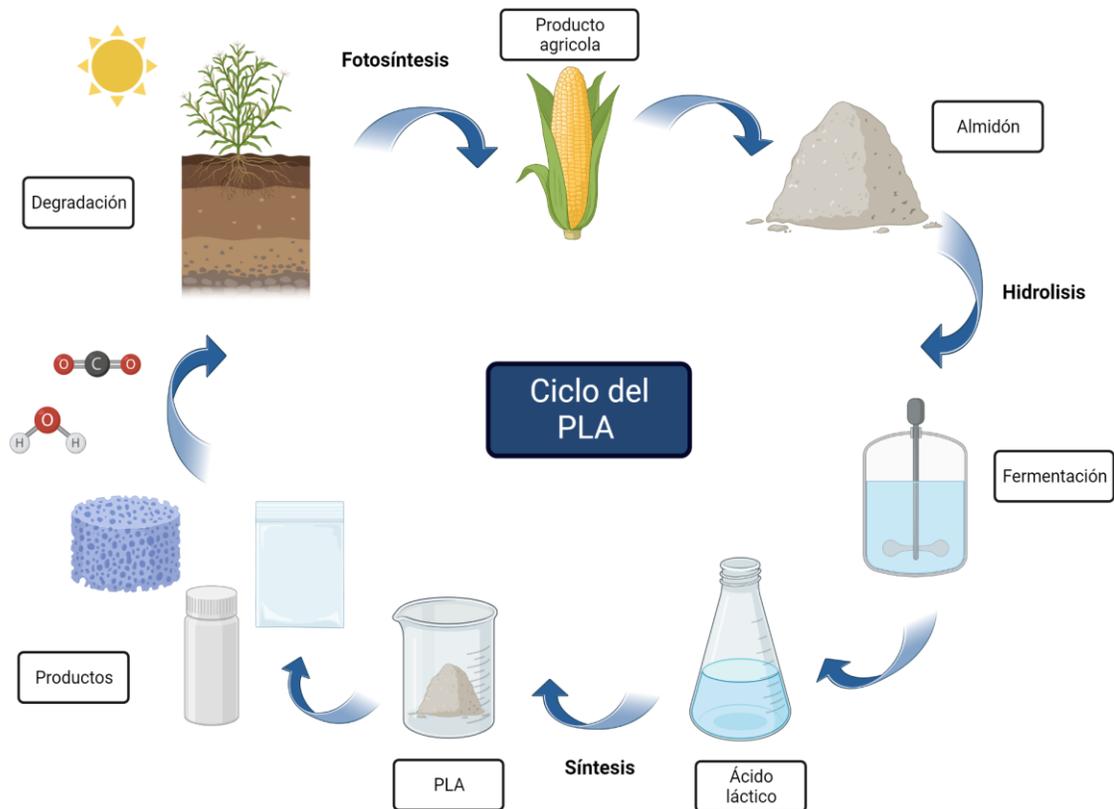


Figura IV. 5. Ciclo del PLA en la naturaleza. Modificada de Xia L y colaboradores <sup>28</sup>.

El PLA es un material versátil que puede elaborarse con diferentes formulaciones para satisfacer especificaciones y así mejorar sus propiedades. Puede ser biodegradable en agua, dióxido de carbono y material orgánico. Al final del ciclo de vida del material puede descomponerse en partes más simples o bien de manera que no quede ninguna señal del producto original <sup>28,29,35,36</sup>.

El campo de la medicina ha aceptado este polímero por ser biodegradable, reabsorbible y biocompatible. La importancia que ha cobrado en la industria médica ha sido por su aceptación y uso en cirugía, ortopedia, ortodoncia, oftalmología y traumatología y otras ramas de la medicina <sup>37</sup>.

#### *IV.5.1 Biodegradabilidad*

La degradación del PLA dependerá de su cristalinidad y peso molecular. La degradación del PLA es más lenta si la cristalinidad es elevada, si el contenido de L-P.L.A. es fuerte y si el peso molecular es elevado. En presencia de PLA, los microorganismos (hongos y bacterias) colonizan la superficie del polímero y son capaces de segregar enzimas que rompen en pequeños fragmentos el polímero; la colonización de la superficie depende de factores tales como la tensión superficial, porosidad y textura superficial y accesibilidad a las cadenas de polímeros. Los grupos hidrófilos de las enzimas (-COOH, -OH, -NH) atacan los grupos éster de las 2 cadenas de polímeros mediante reacciones de hidrólisis seguida por reacciones de oxidación, de esta forma reducen el polímero a fragmentos de peso molecular inferiores a 500g/mol, los cuales pueden ser digeridos por los microorganismos. Las reacciones enzimáticas ocurren generalmente en medio acuoso. Las condiciones necesarias para que se pueda producir el proceso de biodegradación son: Presencia de microorganismos, oxígeno, humedad, nutrientes minerales, temperaturas entre 20 a 60°C dependiendo de microorganismo y pH entre 5-8 <sup>38</sup>.

#### *IV.5.2 Bio-reabsorción*

En tejidos vivos el PLA se despolimeriza totalmente por hidrólisis química. La degradación del polímero comienza por una pérdida de peso molecular y se termina por una pérdida de masa, con descomposición del polímero en monómeros y fagocitosis por los macrófagos. La ausencia de un proceso enzimático realizado por la reabsorción del polímero genera una débil reacción a los tejidos, que se limita a una reacción de cuerpo extraño. El ácido láctico se degrada por vía de lactatos y piruvatos y seguidamente es eliminado en forma de CO<sup>2</sup>, esencialmente por vía respiratoria <sup>28,29</sup>.

#### *IV.5.3 Bio-compatibilidad*

Fue sometido a procedimientos *in vitro* tanto como *in vivo* para evaluar directamente la citotoxicidad, respuesta alérgica, irritación, inflamación y toxicidad crónica y sistémica. Los estándares de estas evaluaciones fueron sometidos por la Organización Internacional de Estandarización ISO 10993. Sin mencionar que también es aprobado por la FDA <sup>38,36</sup>.

#### *IV.5.4 Propiedades del PLA en ingeniería de tejidos*

El poliácido láctico como todo material tiene ventajas, así como desventajas. Un ejemplo, de ello es su resistencia a los rayos UV, elasticidad, rigidez, posee características físicas buenas en cuanto a transparencia, hidrofobicidad y biocompatibilidad. Algunas de sus desventajas es su alta temperatura de cristalización, y que tiende a ser quebradizo. Si bien el PLA tiene un carácter hidrofóbico puede ser combinado con otros materiales para que sea hidrofílico si es necesario. Su temperatura de fusión ( $T_m$ ) de 120-170°C, temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) 54-56°C, es un polímero semi cristalino y tiene 37% de cristalinidad. Respecto a sus características mecánicas, presentan un módulo de tracción de 3.5 GPa y una resistencia a la tracción de 52 MPa <sup>40,41</sup>.

#### *IV.5.5 PLA Técnica FDM*

El poliácido láctico ha sido protagonista al hablar del reemplazo de polímeros desarrollados por petroquímica para ciertas aplicaciones industriales <sup>30,41,42</sup>.

Además, el PLA es un material mejor para imprimir puesto que tiene propiedades mecánicas significativamente mayores a las de otros termoplásticos como el policarbonato y otras mezclas de compuestos. Sin embargo, este polímero es poco estudiado con relación a la técnica FDM, a pesar de, su gran potencial es renovable, compostable y biocompatible <sup>33, 43</sup>.

Aunque hay estudios que indican que la temperatura es uno de los parámetros más importantes para obtener calidad y precisión al crear constructos con PLA. Otra característica evaluada ha sido la influencia de la pigmentación, de las propiedades establecidas por el fabricante son iguales a pesar del cambio de color <sup>32,35</sup>.

En investigaciones previas también se muestra que este material es muy sensible a la humedad, las condiciones ambientales pueden ser importantes a la hora de fabricar tanto el polímero como cualquier constructo con el andamio, por lo que también se tiene que buscar el estandarizar las condiciones del ambiente en el que se fabrica, pues estas tendrán un impacto significativo en el resultado <sup>38,44</sup>.

## V. Planteamiento del problema

El campo de investigación de ingeniería tisular se enfrenta a importantes retos en la reparación o la sustitución de tejidos, a pesar de los muchos avances alcanzados. Los biomateriales utilizados en la construcción de andamios juegan un papel protagónico por lo que deben de cumplir una serie de requisitos como; ser biocompatibles, biodegradables, cumplir con ciertas pruebas mecánicas, y una superficie química apropiada que pueda favorecer la adhesión, diferenciación y proliferación celular.

El PLA es un biomaterial utilizado en el área médica, así como, en la ingeniería tisular debido a sus propiedades, sin embargo, no existe la suficiente información documental del porqué cierto color tiene mejor o deficiente respuesta. Al distinguir entre sus propiedades, nos da una ventaja en la selección del material idóneo, para la síntesis de andamios y así avanzar en nuevas tecnologías en beneficio para el área de la salud. Por lo cual nos hacemos la siguiente pregunta de investigación ¿El pigmento del PLA influye en su respuesta *in vitro* e *in vivo* de andamios impresos en 3D?

## **VI. Objetivos**

### **VI.1 Objetivo general**

Evaluar la estructura superficial y respuesta celular de andamios impresos en 3D, blancos y transparentes.

### **VI.2 Objetivo específicos**

- Analizar la estructura del andamio (superficie, porosidad y tamaño de poro).
- Determinar las propiedades mecánicas del material
- Observar la respuesta celular en el andamio
- Determinar la respuesta de viabilidad celular
- Estimar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina.
- Describir la respuesta inflamatoria

## VII. Justificación

Al imprimir el diseño establecido bajo las mismas condiciones; es decir, parámetros de impresión (temperatura, velocidad, soporte, etc.) casa comercial de la impresora, ambiente del material etc., se observó que el andamio impreso con PLA blanco era más frágil en comparación al transparente. Por lo cual se plantea la pregunta ¿Habrá algún cambio en la respuesta celular in vivo e in vitro de andamios de PLA impresos 3D blancos y transparentes? Al indagar se encontró evidencia científica que reporta un cambio por la ausencia de pigmento en cuanto a la técnica de impresión, modelado por deposición fundida. Si bien en estos estudios se habla de la importancia en cuanto a los parámetros de impresión, los cuales son más de 100 presenta un reto para la disciplina ya que estos varían de estudio a estudio. A pesar de esta información se utiliza de manera indistinta el PLA con o sin pigmento. El siguiente estudio evalúa diferentes características de los andamios para conocer si es que hay o no diferencia y con ello garantizar una elección de un material idóneo para la creación de andamios para la regeneración tisular guiada.

## VIII. Hipótesis

El andamio impreso en 3D de PLA blanco tendrá una mejor estructura superficial, así como una respuesta celular favorable en comparación con el andamio 3D transparente.

## IX. Material y método

### IX.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio fue descriptivo longitudinal.

### IX.2 Universo de estudio

El universo de estudio fue de 50 andamios impresos 3D con PLA blanco y 50 andamios impresos 3D con PLA transparente.

### IX.3 Criterios de selección

- Criterios de inclusión
  - Andamios de PLA blanco con un diámetro de 9mm.
  - Andamios de PLA transparente con un diámetro de 9mm.
- Criterios de exclusión
  - Andamios que no tengan el diámetro y/o diseño.
  - Andamios que no sean de PLA blanco o transparente.
- Criterios de eliminación
  - Andamios dañados por defectos de impresión.
  - Andamios dañados por manipulación.

## IX.4 Variables

Variables Independientes	Definición operacional	Escala de medición
PLA blanco	Filamento de Poliácido láctico de color blanco de 1.75 mm de diámetro.	Variable cualitativa nominal
PLA transparente	Filamento de Poliácido láctico transparente de 1.75 mm de diámetro.	Variable cualitativa nominal

Variables Dependientes	Definición operacional	Escala de medición
Porosidad	Fracción del volumen de espacios vacíos sobre el volumen total.	Variable cuantitativa continua
Tamaño de poro	Diámetro de espacios vacíos en un material o estructura.	Variable cuantitativa continua
Alizarina roja	Ensayo colorimétrico que tiñe depósitos de calcio.	Variable cuantitativa continua
Fosfatasa alcalina	Ensayo colorimétrico que evalúa la actividad de la enzima fosfatasa alcalina.	Variable cuantitativa continua
WST-1	Ensayo colorimétrico que mide la viabilidad celular.	Variable cuantitativa continua

## IX.5 Técnica

### *Impresión de los andamios*

Se seleccionó un diseño previamente realizado por el grupo de investigación del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, DEPEI, UNAM. Posteriormente, se ajustaron los parámetros de cama, punta y temperatura. Se imprimieron 50 andamios en PLA blanco y 50 andamios en PLA transparente. Finalmente, se retiró el material de soporte de cada andamio con pinzas de curación y cúter.

### *Evaluación de la estructura superficial*

Se tomaron imágenes de micrografía con el microscopio electrónico de barrido (MEB) JEOL 5600 LV con un voltaje de operación de 25 kV, con un aumento de 25x, en el Laboratorio Central de Microscopía del IFUNAM. Las muestras fueron preparadas previo a su observación con un recubrimiento de película de oro mediante la pulverización catódica asistida por plasma.

### *Porcentaje de Porosidad*

Se pesaron 6 andamios blancos y transparentes individualmente. Posteriormente se tomaron 100 ml de agua miliQ en un vaso de precipitados de plástico. Se taró la báscula con el vaso de precipitado para sumergir el andamio y se registró el peso. El andamio se mantuvo sumergido por 30 min y después se volvió a pesar. Se creó un registro en Excel con los tres pesos; peso seco, peso suspendido y peso sumergido. La fórmula empleada para el porcentaje de porosidad del andamio fue:

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

$W_{\text{sat}}$ = andamio saturado de agua.

$W_{\text{dry}}$ = andamio seco

$W_{\text{sus}}$ = andamio suspendido en agua.

$W$ = peso.

### *Cultivo celular*

Se utilizó la línea celular de osteoblastos fetales humanos (HFOB) del DEPEL. Se usó medio de cultivo DMEM/F-12 (medio Eagle modificado de Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (Penicilina 1000 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 CO<sub>2</sub> en un ambiente con 100% de humedad. Los andamios previamente fueron esterilizados con gas de óxido de etileno. Se realizó cambio de medio al tercer día a medio osteogénico (50 µM de ácido ascórbico, 10 mM de B-glicerofosfato y 10<sup>-7</sup> M de dexametasona) como inductor a la diferenciación.

### *Ensayo de Viabilidad celular (WST-1)*

Con el objetivo de evaluar la viabilidad de las células HFOB en los andamios impresos en 3D, se utilizó el ensayo WST-1, el cual se fundamenta en la transformación de la sal de tetrazolio WST-1 (4-[3-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) a formazán soluble 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.

### *Ensayo de Fosfatasa alcalina (ALP)*

Para evaluar la actividad ALP en los andamios con células HFOB en medio osteogénico, se usó el ensayo colorimétrico ALP (Abcam, Cambridge, Reino Unido) que se basa en la desforilación de pNPP por la enzima ALP que genera un color amarillo.

### *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 HFOB, en un medio osteogénico, sobre los andamios 3D clasificados por su tiempo de degradación usando el kit de tinción de (ARS) con una solución de 40 mM pH 4.2 (Osteogénesis Kit, Millipore).

### *LUCM estructura superficial de andamios con células*

Se tomaron imágenes de micrografía con el LUCM. Microscopio Electrónico de Barrido de Ultra-Alta Resolución JSM-7800F en el Laboratorio Central de Microscopía del IFUNAM. Las muestras fueron preparadas previo a su observación con un recubrimiento de película de oro mediante la pulverización catódica asistida por plasma.

### *Intervención quirúrgica*

Se utilizaron 9 ratas *Wistar* macho. 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, a continuación, se realizó una incisión lineal de 2 cm a través de la piel en el dorso de la rata. Posteriormente con unas pinzas mosco-delgadas se separaron los tejidos para implantar los andamios en cada costado, derecho blanco, izquierdo transparente. Se mantienen en observación por el periodo de 7, 21 y 41 días.

#### *Eutanasia de los animales*

Al concluir el tiempo establecido, se llevó a cabo la eutanasia animal, utilizando monóxido de carbono para evitar el dolor y sufrimiento hasta llegar el paro cardiorrespiratorio, de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO1999. Después se hizo la recolección del tejido subcutáneo con el andamio para fijar en formol al 10% durante 24 horas para su fijación.

#### *Histología*

Las muestras obtenidas del tejido después de su fijación con formol al 10%. Se cortaron para obtener laminillas de 5 micras de grosor y fueron teñidas con hematoxilina y eosina, para posteriormente ser observadas a un aumento de 10x.

### **IX.6 Análisis estadístico**

#### *Resultado celular in vitro*

En el ensayo de WST-1 se realizó una prueba ANOVA de 2 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

En el ensayo de fosfatasa alcalina se realizó una prueba ANOVA de 2 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

## X. Resultados

### X.1 Descripción superficial del andamio

Se imprimieron andamios en 3D de color blanco y transparente, (Figura. X.1) se puede observar una fotografía donde se comparan estos dos, es preciso mencionar que el blanco presenta una mejor definición en cuanto a la estructura de sus poros y micro canales en comparación del andamio transparente.

El diseño del andamio tiene un diámetro de 9 mm y 1 mm de grosor. Una vez, impreso el andamio con diferente color de PLA se midió el diámetro y grosor para comparar con respecto al diseño. El andamio blanco presento un diámetro de 9.15mm y 1.01mm de grosor mientras que el andamio transparente presento un diámetro de 8.96mm y grosor de 0.97mm.

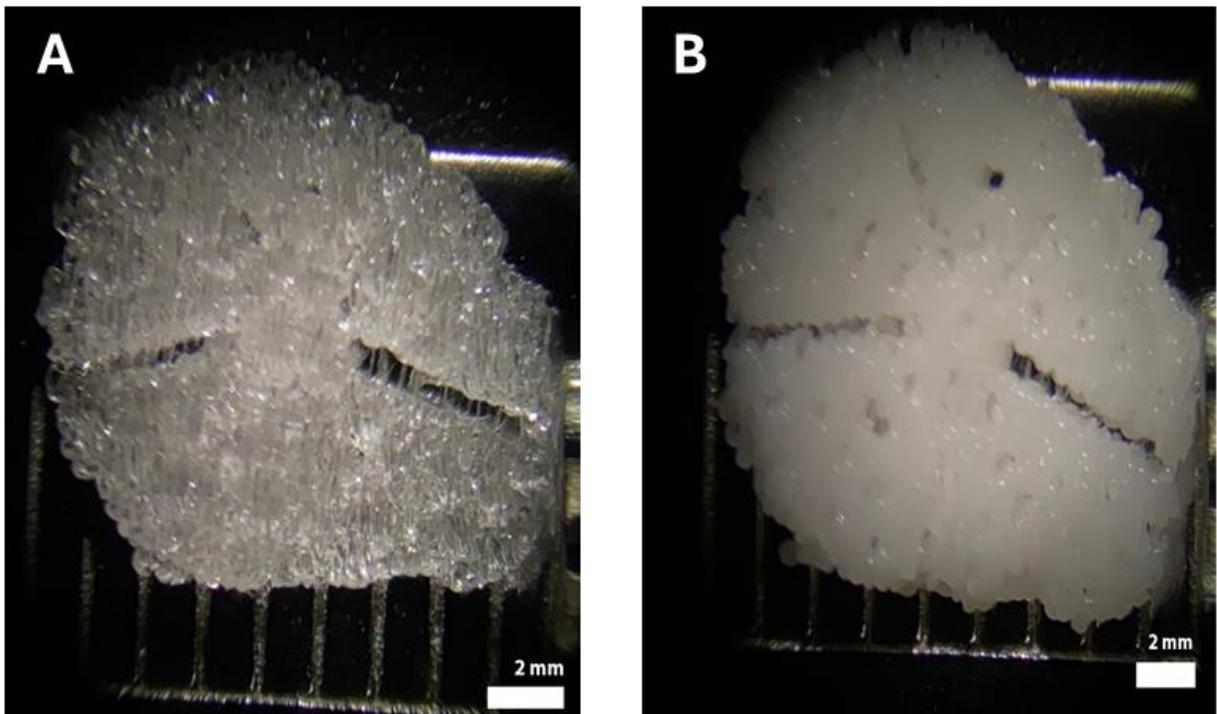


Figura X.1. Estructura superficial de andamios de PLA impresos 3D. A) Andamio de PLA transparente. B) Andamio de PLA blanco.

## X.2 Tamaño de poro

A partir de imágenes MEB, se utilizó el software Image J, para obtener la medición del diámetro de los poros de ambos andamios. Posteriormente, se analizaron los datos con el software SPSS 50, en el cual se observa que el tamaño de poro se apega al diseño y sus poros heterogéneos.

En el caso del andamio blanco se observa una mayor tendencia de poros abiertos respecto al transparente. En el andamio blanco se observa que las mediciones de los poros abiertos llego hasta las 700  $\mu\text{m}$  mientras que en el transparente los poros únicamente alcanzaron las 600  $\mu\text{m}$ . En cuanto, a los poros ciegos el diámetro de poro menor del andamio blanco midió 100  $\mu\text{m}$  a diferencia del andamio transparente en el cual su diámetro de poro menor midió de 50  $\mu\text{m}$ .

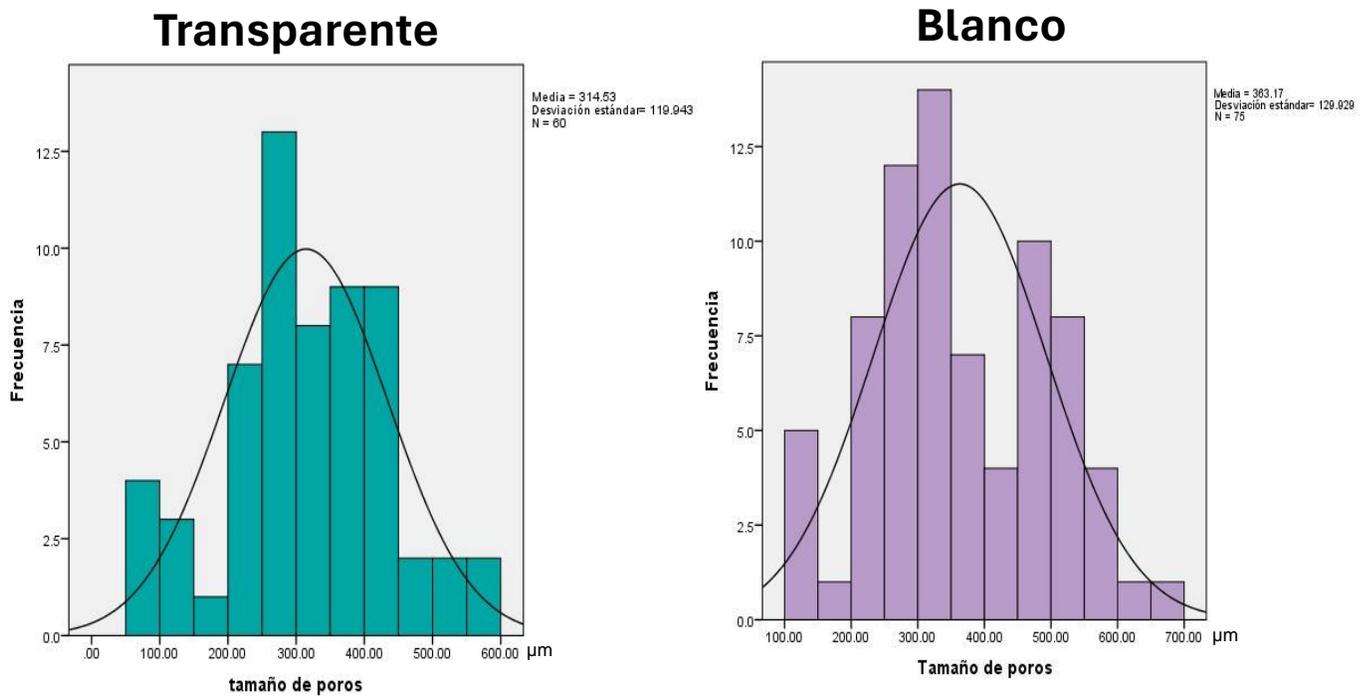


Figura X.2. Frecuencia de tamaño de poro. Histograma con el rango de tamaño de poro, del lado izquierdo el andamio de PLA transparente y del lado derecho el andamio de PLA blanco.

### X.3 Porcentaje de Porosidad

Después de haber utilizado el principio de Arquímedes, así como, la fórmula descrita en la metodología. El porcentaje de porosidad obtenido del andamio blanco fue 67% mientras que en el andamio transparente fue de 53%.

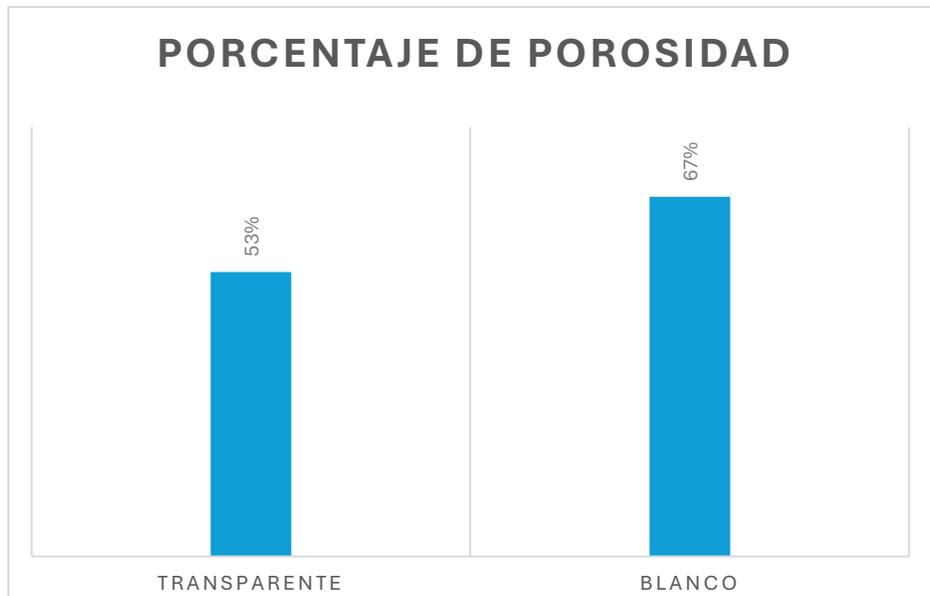


Figura X.3. Porcentaje de porosidad. Se representa gráficamente el porcentaje de porosidad del lado izquierdo transparente y derecho andamio blanco.

#### X.4 Pruebas mecánicas

Se evaluaron las propiedades mecánicas con una prueba de compresión, cuyos resultados se interpretan por medio de la curva esfuerzo-deformación. Se obtuvo el Módulo de Young de cada andamio, dando como resultado 1.607MPa para el andamio blanco como 2.431 MPa en el andamio transparente.

#### Curva esfuerzo - deformación

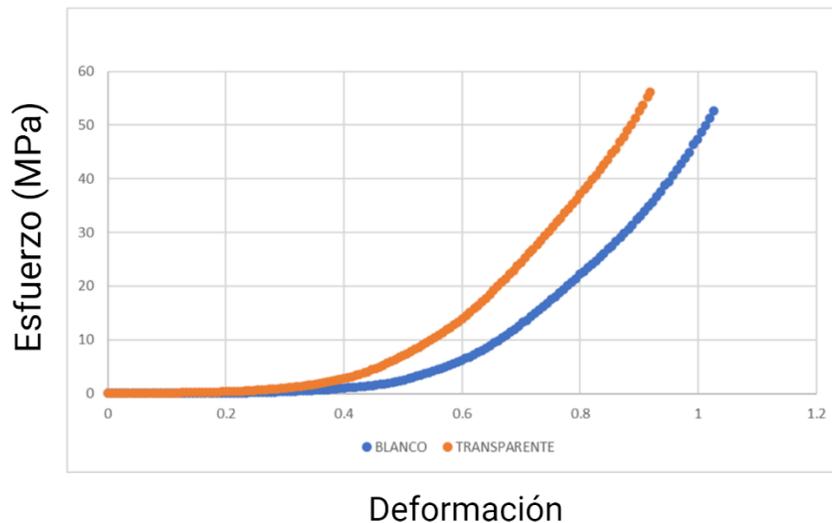
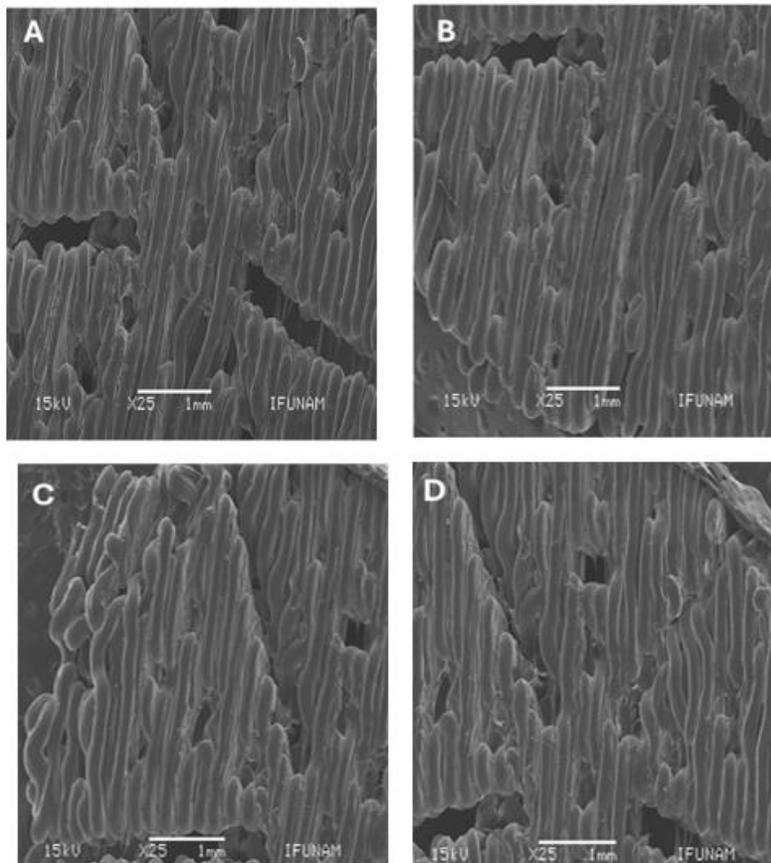


Figura X.4. Gráfica de esfuerzo-deformación. Se observa la resistencia de ambos andamios ante la compresión. El andamio de PLA blanco representado por el color azul y el PLA transparente por el color anaranjado.

## X.5 Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

### X.5.1 Blanco

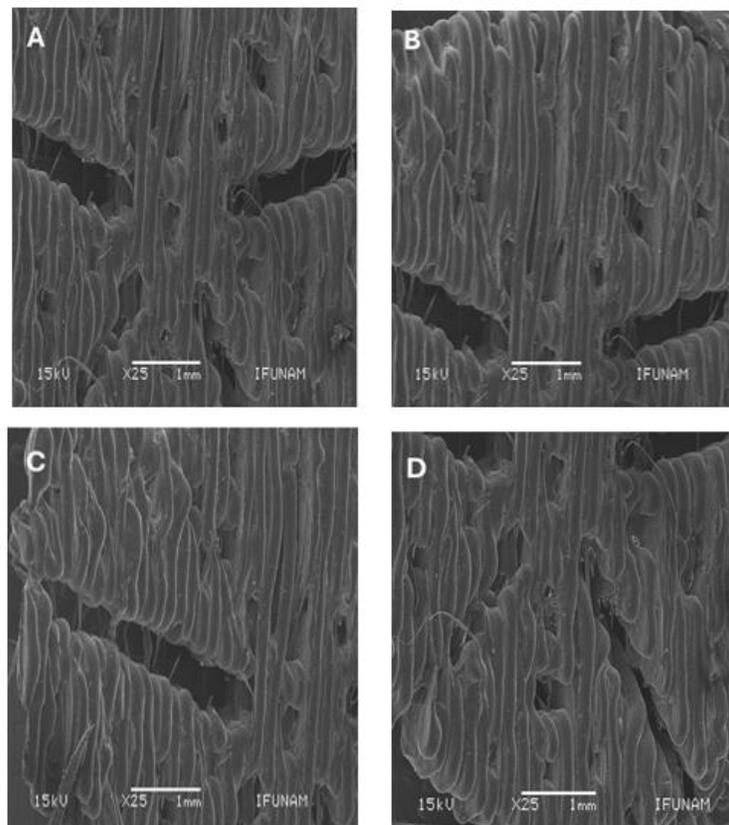
Los andamios fueron recubiertos con oro para poder ser observados en Microscopio electrónico de barrido. En las cuales se lograron estudiar la estructura superficial de ambos andamios con distinto color de PLA. En el andamio de PLA de color blanco, se puede apreciar una buena definición de poro, el cual se apega al diseño original. Se observa el material depositado capa por capa, donde cada capa está delimitado y con bordes definidos. También se aprecian fibras delgadas entre los micro canales debido a la técnica, sin embargo, estas fibras del material no obstruyen el micro canal por lo contrario está delimitada el micro canal. En la imagen de la región central del andamio se pueden observar tanto los poros abiertos como cerrados.



**Figura X.5. Imágenes MEB del andamio en 3d impreso con PLA blanco** Se observa en la imagen A) Centro del andamio. B) Lateral derecho del andamio. C) Se aprecian el filamento depositado capa por capa. D) Parte superior del andamio.

### X.5.2 Transparente

Los andamios fueron recubiertos con oro para poder ser observados en Microscopio electrónico de barrido. En las cuales se lograron estudiar la estructura superficial de ambos andamios con distinto color de PLA. En cuanto al andamio impreso con PLA transparente se observa una pérdida de definición en los poros. Los micro canales se encuentran obstruidos por la deposición del material, así como algunos poros abiertos. A diferencia de la imagen del andamio blanco no presenta capas de material definidas, al contrario, se unen entre ellas para formar una capa sin bordes definidos. Se observan los poros abiertos con bordes indefinidos y con algunas fibras de material, estas fibras del material se ven de un extremo del andamio a otro. Se aprecian algunas conglomeraciones del filamento en poros tanto cerrados como ciegos.

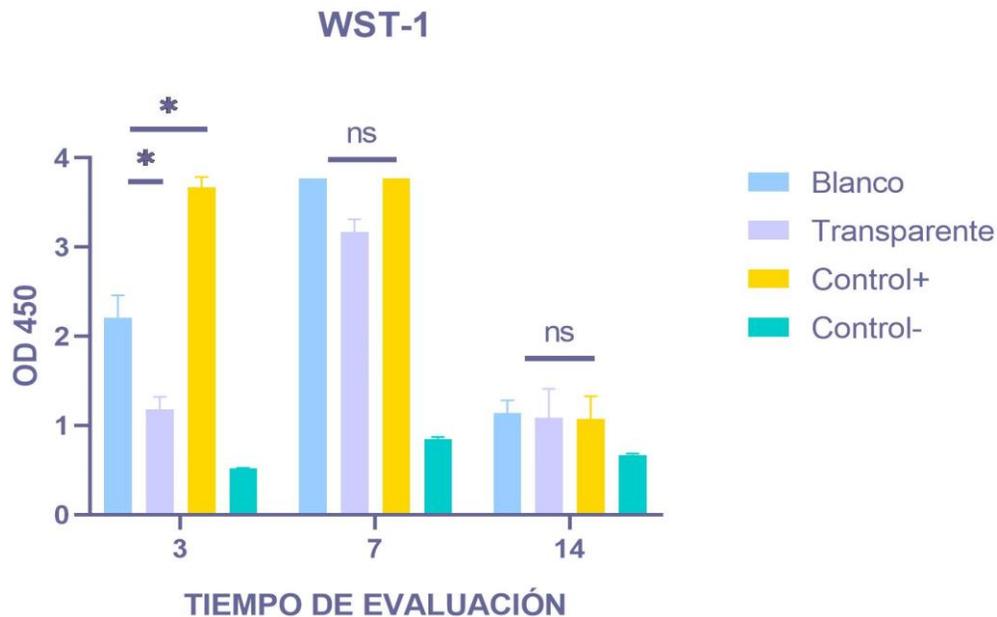


**Figura X.6. Imágenes MEB del andamio en 3d impreso con PLA transparente.** Se observa en la imagen A) Poros obstruidos de la zona central del andamio. B) Se observa la zona lateral de andamio con poros indefinidos. C) Se aprecian el filamento depositado capa por capa conglomerada. D) Vista de la parte superior del andamio, donde se ven poros obstruidos por filamento, así como filamento excedente.

### X.6 Ensayo de viabilidad celular (WST-1)

El ensayo de WST-1 se utiliza para medir la viabilidad celular. Posteriormente, de haber cultivado la línea celular de hFOB en los andamios impresos 3D de PLA blanco y transparente se evaluaron la respuesta de viabilidad celular a los 3, 7 y 14 días. Después de medir su observancia se hizo un análisis que es representado con el grafico (Fig. X.7).

En donde se puede observar que no hubo diferencia significativa entre el andamio impreso con PLA blanco y el transparente, como muestra el gráfico. Sin embargo, en el tercer día existe una diferencia estadísticamente significativa del andamio transparente respecto al blanco contra transparente, así como con el control positivo.



**Figura X.7. Gráfica del ensayo de viabilidad celular (WST-1).** Los asteriscos muestran diferencia estadísticamente significativa

## X.7 Ensayo de fosfatasa alcalina

La prueba de fosfatasa alcalina permite medir la actividad de esta enzima. Posteriormente, de haber cultivado la línea celular de hFOB en los andamios impresos 3D de PLA blanco y transparente se evaluaron la respuesta de viabilidad celular a los 3, 7 y 14 días. Después de medir su absorbancia se hizo un análisis que es representado con el grafico (Fig.X.8).

No hubo diferencia significativa tanto en el día 7 como 14. Sin embargo, en el día 3 tanto el andamio impreso con PLA blanco como el transparente, mostraron diferencia significativa contra el grupo control, lo cual nos indica que la enzima presenta mayor actividad en los primeros días de evaluación como se observa en la (Fig.X.8)

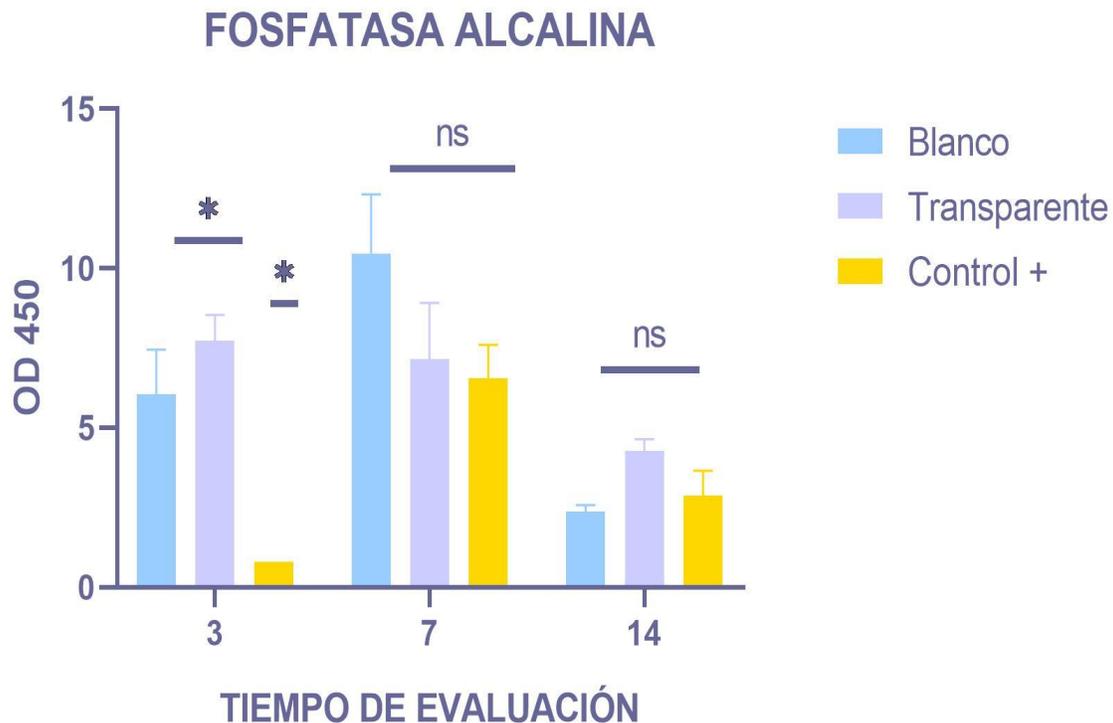


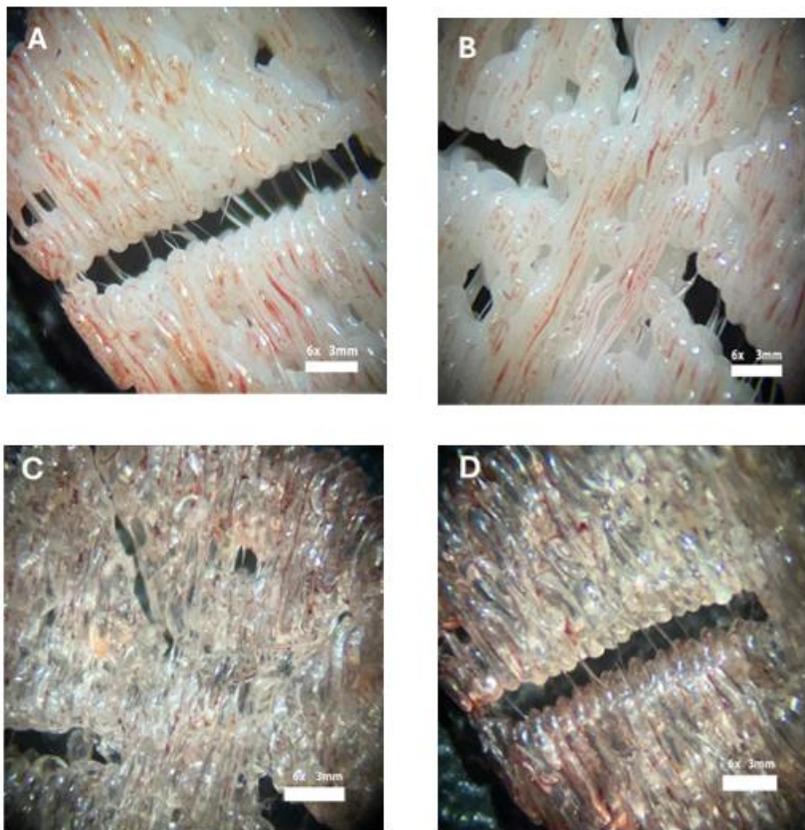
Figura X.8. Gráfica del ensayo de fosfatasa alcalina. Los asteriscos muestran diferencia significativa.

## X.8 Ensayo de Alizarina Roja

### X.8.1 7 días

El ensayo de Alizarina Roja (ARS), se usó para la detección visual de los depósitos de calcio formados por las células hFOB. Las cuales se evaluaron el día 7 tanto como 14.

Después de la tinción con alizarina roja y desecado de las muestras se observan depósitos de calcio formado en mayor cantidad en el andamio blanco, así como una ligera tinción entre las capas del material, mientras que en el andamio transparente solamente se aprecia una ligera tinción entre las capas depositadas del material.

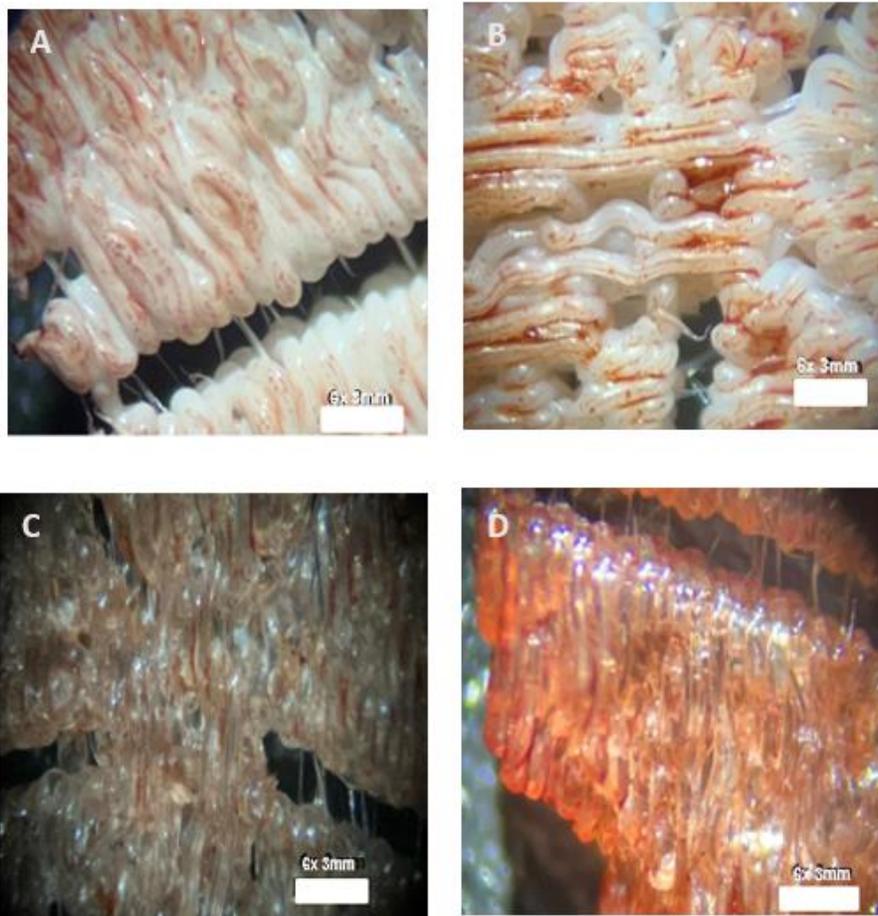


**Figura X.9. Andamios con células HFOB a los 7 días teñidos con alizarina roja.** A) Zona inferior del andamio de PLA blanco con formación moderada de depósitos de calcio. B) Zona centro del andamio de PLA blanco con formación moderada de depósitos de calcio. C) Zona centro del andamio de PLA transparente con escasas formación de depósitos de calcio. D) Nula presencia de depósitos de calcio en la zona inferior de andamio de PLA transparente.

### IX.8.2 14 días

El ensayo de Alizarina Roja (ARS), se usó para la detección visual de los depósitos de calcio formados por las células hFOB. Las cuales se evaluaron el día 7 tanto como 14.

Después de la tinción con alizarina roja y desecado de las muestras se observan depósitos de calcio más definidos y teñidos con respecto a los de los 7 días. Se formaron en mayor cantidad en el andamio blanco con respecto al transparente y en ambos se aprecia una ligera tinción entre las capas del material.

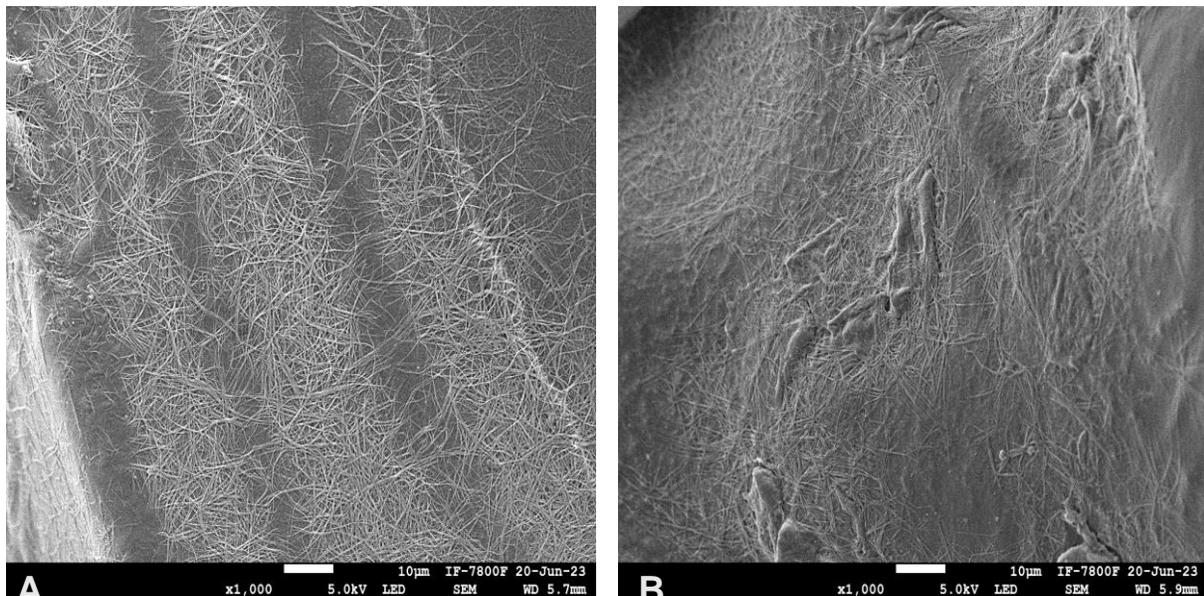


**Figura X.10. Andamios con células HFOB a los 14 días teñidos con alizarina roja.** A) Zona inferior del andamio de PLA blanco con formación de depósitos de calcio. B) Zona centro del andamio de PLA blanco con formación de depósitos de calcio. C) Zona centro del andamio de PLA transparente con nula formación de depósitos de calcio. D) Nula presencia de depósitos de calcio en la zona inferior de andamio de PLA transparente.

## X.9 Imágenes de microscopía electrónica de barrido

### X.9.1 Transparente

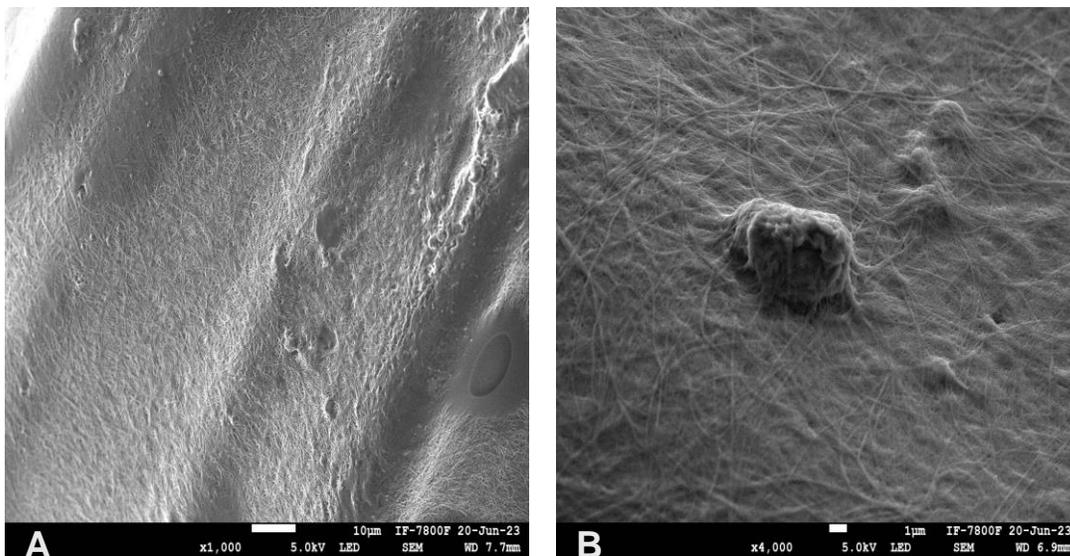
Después de sembrar células hFOB en el andamio transparente se observaron utilizando el equipo LUCM. Microscopio Electrónico de Barrido de Ultra-Alta Resolución JSM-7800F. Se puede observar matriz extracelular en la superficie del andamio. Desde una vista con mayor aumento se logra ver un conglomerado comunicando con la matriz extracelular.



**Figura X.11. Imágenes de MEB a los 7 días con células HFOB.** A) Se observa la zona del andamio y las zonas con matriz extracelular. B) Se observa la matriz extracelular secretada por las células.

### X.9.2 Blanco

Después de sembrar células hFOB en el andamio blanco se observaron utilizando el equipo LUCM. Microscopio Electrónico de Barrido de Ultra-Alta Resolución JSM-7800F. Se puede observar matriz extracelular en la superficie del andamio. Se observa la superficie completamente recubierta por matriz lo que nos confirma que el andamio es un ambiente favorable para la línea celular. Desde un aumento mayor se puede observar la célula recubierta secretando matriz



**Figura X.12. Imágenes de SEM a los 14 días con células HFOB.** A) Se observa la superficie completamente cubierta por matriz extracelular. B) Se observa una intercomunicación entre las fibras de matriz extracelular.

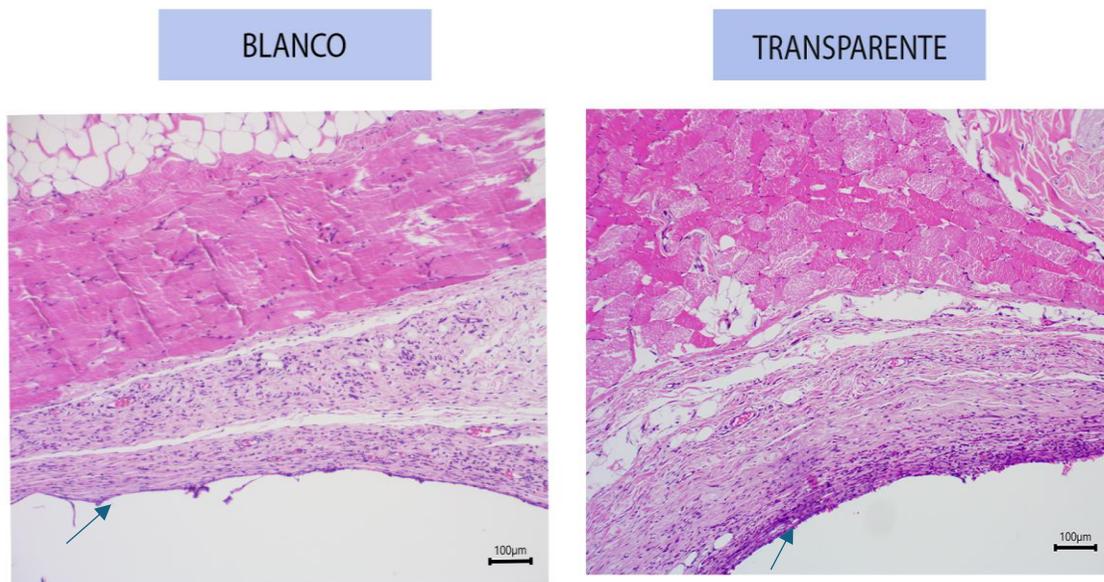
## X.10 Histología

### X.10.1 7 días

Posterior a la implantación de los andamios blancos y transparentes a los siete días, se observa en un corte histológico de 5 micras de grosor, teñidas con hematoxilina y eosina, a un aumento de 10x.

El correspondiente al blanco presenta una respuesta inflamatoria aguda, con moderadas células inflamatorias y formación de vasos sanguíneos. Se puede observar la presencia de una cápsula fibrosa alrededor de la luz, donde se encontraba el andamio.

En el transparente se puede observar una mayor respuesta inflamatoria aguda y escasa formación de vasos sanguíneos. Se muestra una cápsula fibrosa de mayor grosor alrededor de la luz, en comparación del blanco.

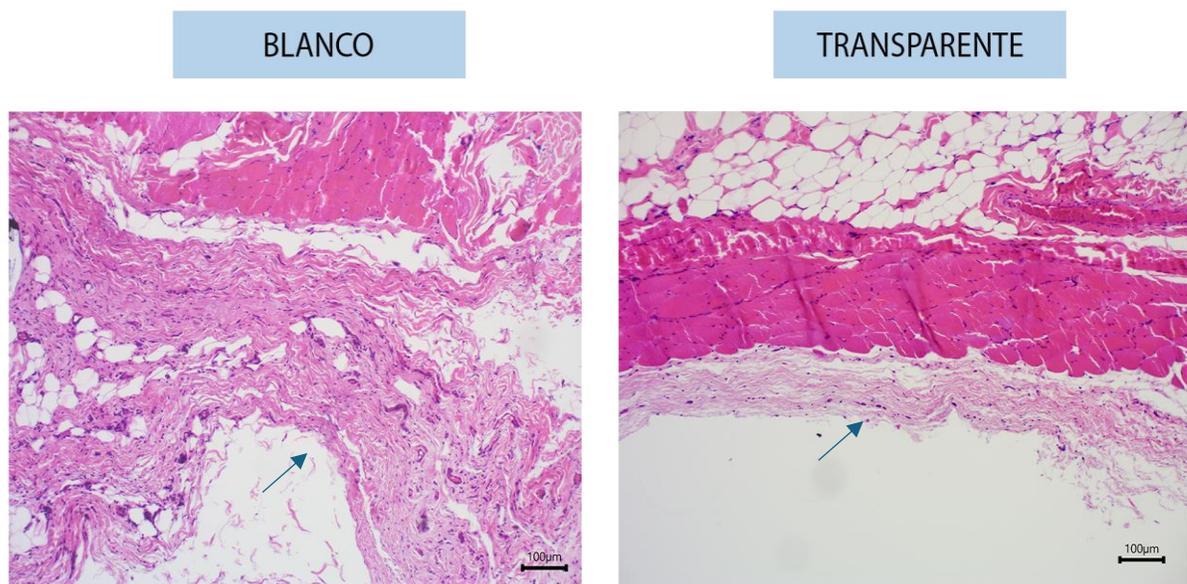


**Figura X.13. Muestra histológica 7 días.** Se observa una respuesta inflamatoria aguda en ambos andamios impresos 3D. Se señala con flecha de color azul la cápsula fibrosa alrededor de la luz.

### X.10.2 21 días

Posterior a la implantación de los andamios blanco y transparente a los 21 días, se observa en un corte histológico de 5 micras de grosor, teñidas con hematoxilina y eosina, a un aumento de 10x. En el blanco se puede observar tejido fibroso denso con abundantes células gigantes de tipo cuerpo extraño. Escasa formación de vasos sanguíneos y la formación de una cápsula de tejido conectivo fibroso en la luz de mayor grosor con el transparente.

La respuesta del andamio transparente presenta infiltrado inflamatorio crónico con escasas células gigantes de tipo cuerpo extraño y escasa formación de vasos sanguíneos. La cápsula es de tejido conectivo fibroso sin presencia de tejido hacia la luz.

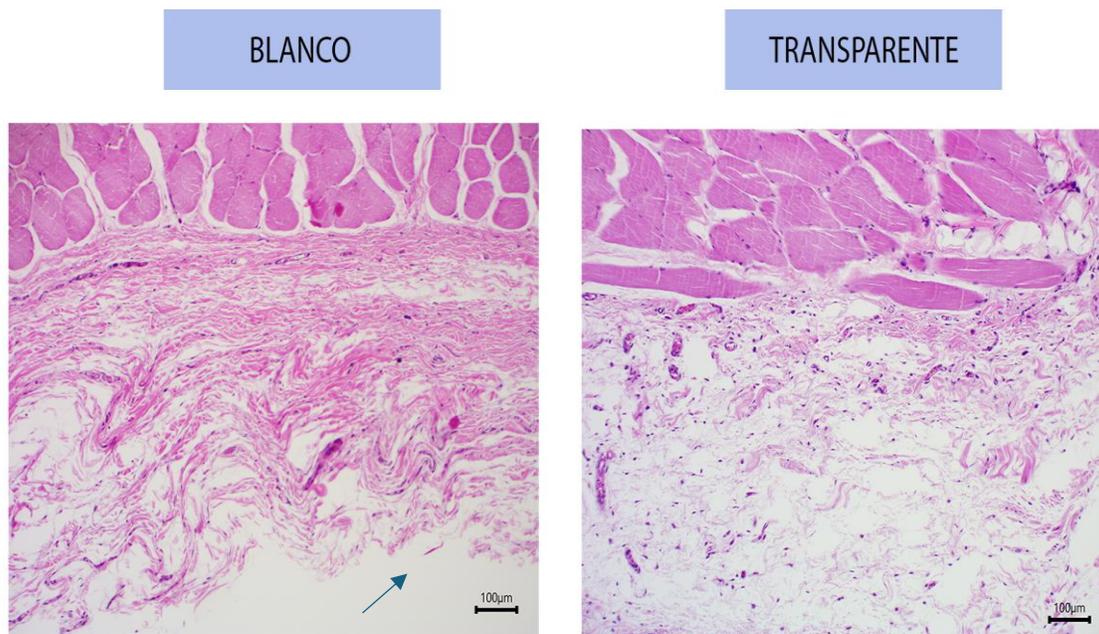


**Figura X.14. Muestra histológica 21 días.** Se observan células gigantes de tipo cuerpo extraño y escasa formación de vasos sanguíneos en el andamio blanco, mientras que la transparente muestra infiltrado inflamatorio crónico. Se señala con una flecha de color azul la capsula de tejido conectivo fibroso.

### X.10.3 41 días

Posterior a la implantación del andamios blanco y transparente a los 41 días se observa en un corte histológico de 5 micras de grosor, teñidas con hematoxilina y eosina, a un aumento de 10x. En el blanco se observa escaso infiltrado inflamatorio crónico sin presencia de células gigantes de tipo cuerpo extraño y moderada formación de vasos sanguíneos. La formación de la cápsula es de tejido conectivo fibroso laxo.

En cuanto a la respuesta del andamio transparente se puede observar la presencia de escasas células de inflamación crónica, leve formación de vasos sanguíneos, así como tejido conectivo fibroso laxo.



**Figura X.15. Muestra histológica 41 días.** Se observa escasas células de inflamación crónica. Mayor formación de vasos sanguíneos en el andamio blanco que el transparente. Se señala la cápsula de tejido conectivo fibroso laxo con una flecha de color azul.

## XI. Discusión

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario, encargado de desarrollar distintos materiales que reemplacen la función. Es importante proveer el ambiente y condiciones para lograr una adecuada regulación celular y una entrega de factores bioactivos<sup>7</sup>. A medida del avance tecnológico se debe ir creando conciencia en estandarizar los biomateriales logrando que sean de primer nivel y de fácil acceso para que estas técnicas sean reproducibles. El uso de PLA en el área médica es común debido a su buena biocompatibilidad, biodegradabilidad aparte de ser bioactivo y bioabsorbible<sup>8</sup>.

Dentro de sus ventajas permite sintetizar andamios complejos y su desventaja es que su superficie es hidrofóbica, por lo que varios autores buscan el combinarlo con otros materiales, moléculas, y proteínas<sup>6</sup>. Una de las más recomendadas en distintas fuentes en las que se trabaja con célula es combinar este material con Quitosano para mejorar, ya que neutraliza el pH que está comprobado que el pH del PLA modifica el entorno celular<sup>8</sup>. Sin embargo, en este estudio se decidió utilizar únicamente el PLA natural de gama comercial de color blanco y transparente, ya que se presenta una limitada evidencia científica.

Estos andamios fueron sometidos a un proceso de esterilización a través de Plasma de Peróxido de Hidrógeno, el cual modifica la superficie del PLA en hidrofílica, favoreciendo la adhesión celular.<sup>7</sup>

En imágenes de MEB, así como microscopio estereoscopio se observaron ambos andamios y se logró distinguir una diferencia superficial. El andamio impreso en 3D de PLA blanco mantuvo su fidelidad de detalle, teniendo micro canales y poros bien definidos, mientras que en el andamio impreso 3D de PLA transparente presentó poros no definidos, así como, micro canales obstruidos por el material. Aceptando lo que proponen autores, los cuales establecen que los polímeros sin pigmento al ser sometidos a temperaturas altas aumentan la extrusión del material, debido a

que es más fluido, por consecuencia las capas obstruyen los poros, resultando desfavorable, debido a que permite que el material fluya y al no tener imperfecciones termina modificando el diseño del andamio <sup>8</sup>.

Por otro lado, se debe de considerar que si bien el diseño no fue parte de esta línea de investigación se comprueba la superficie de los andamios con porosidad graduada o heterogénea. Distintos autores establecen que los tamaños de poro que favorecen la regeneración ósea se encuentran en el rango de 100-1000 micras. A pesar de no tener establecido un tamaño de poro ideal se reporta que éste favorece la adhesión, proliferación e incluso influir en la diferenciación osteogénica se encuentre en el rango 100 a 40  $\mu\text{m}$ . De la misma manera se encuentra que el poro en el rango de 500-1000  $\mu\text{m}$  favorece la vascularización <sup>45,46,47</sup>.

Por lo tanto, se logró confirmar la superficie heterogénea del andamio impreso en 3D tanto blanco como transparente. Ya que, a partir de 132 medidas, se localizaron poros con un diámetro de 500-700  $\mu\text{m}$  en el centro del andamio el cual iba disminuyendo en el borde con un rango de 200-400  $\mu\text{m}$  El diseño del andamio cumple con su funcionamiento tomando en consideración tanto la respuesta celular como el crecimiento vascular interno.

La técnica de impresión implementada fue Modelado por Deposición Fundida, esta técnica es rápida comparada con otras y de bajo costo. Sin embargo, presenta limitaciones en cuanto a la resolución por el diámetro de la boquilla, ya que este determina el tamaño mínimo. Además de tener complicaciones cuando se trata de figuras geométricas complejas debido a que los polímeros no tienen la capacidad de mantenerse por la alta temperatura empleada al depositarse, por lo cual, en un estudio previo del grupo de trabajo del laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, DEPEI, UNAM. Se logró estandarizar los parámetros de impresión, logrando poros micrométricos <sup>516</sup>.

En este proyecto se empleó el polímero poliácido láctico (PLA), el cual presenta retos al utilizar la técnica FDM, debido a la dificultad de controlar sus dimensiones por el cambio de volumen y estrés residual causado por altas temperaturas de fusión e impresión. Por lo cual, es clave el tener parámetros establecidos para disminuir estas limitaciones<sup>48</sup>.

La porosidad es un parámetro importante en un andamio impreso 3D, el cual se define como el porcentaje de espacios vacíos de un sólido. El andamio impreso 3D de PLA blanco presentó un porcentaje de porosidad de 67%, mientras que el andamio impreso 3D de PLA transparente presentó un porcentaje de porosidad de 53%. La porosidad es un factor esencial para la permeabilidad de nutrientes e intercambio de oxígeno, ambos fundamentales para cualquier proceso de regeneración. Por consiguiente se podría decir que el porcentaje de porosidad de andamios impresos 3D con PLA blanco y transparente benefician el proceso de regeneración tal como lo establece la literatura.<sup>47,48</sup>

Las propiedades mecánicas de los andamios se ven afectadas por un alto porcentaje de porosidad. Por lo cual, se creyó imprescindible estudiar las propiedades mecánicas de ambos andamios, por medio de la curva de esfuerzo-deformación presentando un módulo de Young de 3.4 MPa en cuanto al andamio impreso 3D de PLA transparente, mientras que el blanco fue de un promedio de 2.3 MPa. Los datos que se obtuvieron difieren con las características ya establecidas del PLA (Módulo de Young de 3100 MPa y esfuerzo máximo de 74) lo que se puede aludir a la diferencia de tamaño y grosor y alto porcentaje de porosidad<sup>49,50,51</sup>.

Con respecto a los resultados celular *in vitro*, se realizaron ensayos de viabilidad celular (WST-1), ensayo de fosfatasa alcalina (ALP), ensayo de alizarina roja (AR), con el objetivo de dilucidar si el cambio de pigmentación en los andamios impresos 3D tendría mejor respuesta celular. Los resultados de viabilidad celular (WST-1) de los andamios impresos 3D de PLA blanco y transparente con células HFOB con diferentes tiempos de evaluación (3, 7 y 14 días) presentaron diferencia significativa

en el día 3 donde el andamio tiene una respuesta favorable con respecto al transparente, así como, ambos andamios respecto al control positivo que sólo contiene células. En el día 7 si bien no existe diferencia significativa se observa un pico de viabilidad celular que posteriormente disminuye en el día 14 <sup>52</sup>.

Los resultados de fosfatasa alcalina de los andamios impresos 3D de PLA blanco y transparente con células HFOB y diferentes tiempos de evaluación (3, 7 y 14 días) se observa un pico en el día 14 a pesar de no tener diferencia significativa. Mientras, en el día 3, existe una diferencia significativa que favorece al andamio impreso 3D de PLA transparente en comparación al control positivo y andamio impreso 3D de PA blanco. Lo que indica mayor actividad enzimática.

En cuanto al ensayo de Alizarina roja (AR), las imágenes se observan los nódulos de calcio en la superficie de los andamios, concentrándose en algunas zonas alrededor de los poros y entre el espacio formado por las capas depositadas del filamento de PLA, en cuanto al andamio impreso 3D de PLA blanco, ya que en el andamio transparente existe una disminución de nódulos, incluso se aprecia menos teñida a pesar de emplear la misma técnica.

La implantación de cualquier biomaterial desencadena una respuesta inflamatoria, como mecanismo de defensa con el objetivo de aislar y eliminar el material extraño e iniciar el proceso de reparación. Este proceso se denomina reacción de cuerpo extraño y se puede dividir en dos fases. Las muestras histológicas de los andamios impresos 3D de PLA blanco y transparente en tejido subcutáneo estudiadas en diferentes tiempos de evaluación (7, 21, 41 días). Presentan inflamación aguda en el día 7 y en el día tanto 21 como 41 ya se presenta una inflamación crónica. El andamio impreso 3D de PLA blanco tuvo mejor formación de vasos sanguíneos <sup>53</sup>.

## **XII. Conclusión**

El andamio impreso 3D con PLA blanco tuvo mejor respuesta *in vitro*, así como *in vivo*. El impacto del pigmento dentro del biopolímero de poliácido-láctico, es de vital importancia puesto que sus propiedades físicas y a la temperatura alteran el diseño. Se comprobó también que el andamio impreso de PLA transparente resistió mejor a las pruebas mecánicas de compresión por lo cual, se puede establecer que sería mejor usar PLA transparente para constructos no porosos.

## **XIII. Limitaciones y Perspectivas**

- Un gran reto para el desarrollo de andamios impresos 3D para la regeneración de tejido óseo por medio de la técnica modelado por deposición fundida (FDM) es la estandarización de parámetros de impresión.
- El uso del poliácido láctico (PLA) como biomaterial de elección no tiene tablas de contenido por lo cual, es importante conocer el pigmento y el cambio a las propiedades. Dada la importancia revelada en este trabajo de investigación.
- A futuro, sería importante realizar defectos de tamaño crítico en ratas y observar su regeneración del tejido óseo.

#### XIV. Referencias

1. Serrato D, Nieto R, Aguilera A. Ingeniería de tejidos. Una nueva disciplina en medicina regenerativa. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. 2015; 64: 61-69.
2. Barbuh *et al.* Guided Bone Regeneration in severely resorbed maxilla. Rev Chir Oro-maxilo-fac Implantol. 2012; 3(1): 24-29.
3. Fabres C. Future's technology: tissue engineering and stem cells in reproductive medicine. Revista Médica Clínica Las Condes. 2012; 21(3):488-493
4. Sándor GKB. Tissue engineering of bone: Clinical observations with adipose-derived stem cells, resorbable scaffolds, and growth factors. Ann Maxillofac Surg. 2012; 2(1): 8–11.
5. Cab C. Sustitutos de tejido óseo. Rev Orthotips. 2014; 10(4): 208-217.
6. Williams DF. Biomaterials and biocompatibility. Med Prog Technol. 1976; 4: 31-42.
7. Raghunath J, Rollo J, Sales KM, Butler PE, Seifalian AM. Biomaterials, and scaffold design: key to tissue-engineering cartilage. Biotechnol Appl Biochem. 2007; 46 (Pt 2): 73-84
8. Morales ND. Ingeniería tisular como puntal de la medicina regenerativa en estomatología. Rev cubana Estomatol. 2014; 51(3): 288-304.
9. Garrido FM. Ingeniería tisular y medicina regenerativa en cirugía pediátrica. Rev Chil Cir. 2011; 63(6): 635-640.
10. Colorado AC, Agudelo CA, Moncada B. Análisis de biomateriales para uso en Ingeniería de tejido de piel: Revisión. Rev. Ing. Biomed. 2013; 7(14): 11-23.
11. Martínez Álvarez O, Barone A, Covani U, Fernández Ruíz A, Jiménez Guerra A, Monsalve Guil L *et al.* Bone grafts and bone substitutes in implant dentistry. Av Odontostomatol. 2018.34(3): 111-119.
12. Liu Y, Luo D, Wang T. Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone TissueEngineering. 2016;1–22. Doi:10.1002/sml.201600626

13. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone*. 2015; 80:14–8. Doi: 10.1016/J.bone.2015.04.035
14. Lumetti S, Galli C, Manfredi E, Consolo U, Marchetti C, Ghiacci G, Toffoli A, Bonanini M, Salgarelli A, Macaluso GM. Correlation between density and resorption of fresh frozen and autogenous bone grafts. *Biomed Res Int* 2014; 2014:508328.
15. Lumetti S, Galli C, Manfredi E, Consolo U, Marchetti C, Ghiacci G, Toffoli A, Bonanini M, Salgarelli A, Macaluso GM. Correlation between density and resorption of fresh frozen and autogenous bone grafts. *Biomed Res Int* 2014; 2014:508328.
16. Hoexter DL. BONE REGENERATION GRAFT MATERIALS. *J Oral Implantol*. 2002;3–7. Doi: 10.2478/v10136-009-0013-9
17. Shibuya N, Jupiter DC. Bone Graft Substitute: Allograft and Xenograft. *Clin Podiatr Med Surg*. 2015;32(1):21–34. Doi:10.1016/j.cpm.2014.09.11
18. Kumar P, Vinitha B, Fathima G. Bone grafts in dentistry. *Dent Sci*. 2013; 5:125–8. Doi:10.4103/0975-7406.113312
19. Intini G, Andreana S, Buhite RJ, Bobek LA. A comparative analysis of bone formation induced by human demineralized freeze-dried bone an enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defect. *J Periodontol* 2008; 79:1217-24.
20. Rincón M. Fabricación y caracterización de una matriz Tridimensional de Hidroxiapatita Macroporosa para aplicación en ingeniería de Tejidos Óseos. *Rev.EIA. Esc. Ing.Antioq*. 2007 7: 87-95
21. Schweiger J. 3D Printing in Digital Prosthetic Dentistry: An Overview of Recent Developments in Additive Manufacturing. 2021 jun: 1-6
22. Soo KP. Obtaining Informed Consent Using Patient Specific 3D Printing Cerebral Aneurysm Model. 2014 4;11:38-45.
23. Juárez AA, Olivos-Meza A, Landa-Solís C, Cárdenas-Soria VH, Silva-Bermúdez PS, Suárez C et al. Uso y aplicación de la tecnología de impresión y bioimpresión 3D en medicina. *Rev. Fac. Med. (Méx.)*. 2018 61;6: 43-51.

24. Kishan AP, Cosgriff-Hernandez EM. Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. *J Biomed Mater Res -Part A*. 2017;105(10):2892–905. Doi:10.1002/jbm.a.36.124
25. Brien CMO, Holmes B, Faucett S, Zhang LG. Three-Dimensional Printing of Nanomaterial Scaffolds for Complex Tissue Regeneration. *tisure Eng Part B Rev* 2015;21(1). Doi:10.1089/ten
26. Li J, Chen M, Fan X, Zhou H. Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications, and prospects. *J Transl Med*. 2016;1–15. Doi:10.1186/s12967-016-1028-0
27. Valenzuela-Villela, K. S., García-Casillas, P. E., & Chapa-González, C. Progreso de la Impresión 3D de Dispositivos Médicos. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, 41(1), 151-166. de 2020.
28. Wickramasinghe S, Do T, Tran P. FDM-Based 3D printing of polymer and associated composite: A review on mechanical properties, defects, and treatments. Vol. 12, *Polymers*. MDPI AG; 2020, pp. 1-42.
29. Serrna L. Ácido Poliláctico (PLA): Propiedades y aplicaciones. 2003. 5; 1:17-25
30. Bajaj P, Schweller RM, Khademhosseini A. 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Annu Rev Biomed Eng*. 2014;(16):247–76. Doi:10.1146/annurv-bioeng-071813-105155.
31. *Front biosci. Frontiers in Bioscience*. 2012;100–28. PMID: 22201735
32. Xiao W, Wang Y, Pacios S, Li S, Graves DT. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Front Oral Biol*. 2015; 18:9–16.
33. Yuval R, Moran HZ, Abraham J, Abraham N. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2016. 107,153-162.
34. 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):48540.
35. 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.
36. Mathew, A.P.; Oksman, K.; Sain, M. Mechanical properties of biodegradable composites from poly lactic acid (PLA) and microcrystalline cellulose (MCC). *J. Appl Polym Sci*. 2005; 97, 2014–2025.
37. Messimer, S.L.; Patterson, A.E.; Muna, N.; Deshpande, A.P.; Rocha Pereira, T. Characterization and Processing
38. Behavior of Heated Aluminum-Polycarbonate Composite Build Plates for the FDM Additive Manufacturing Process. *J. Manuf Mater Process*. 2018, 2, 12.
39. Tymrak, B.M.; Kreiger, M.; Pearce, J.M. Mechanical properties of components fabricated with open-source 3-D printers under realistic environmental conditions. *Mater. Des*. 2014, 58, 242–246.
40. 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.
41. 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. (234), *International journal of biological macromolecules*. NLM. 2023.
42. Kishan AP, Cosgriff-Hernandez EM. Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review. *J Biomed Mater Res -Part A*. 2017;105(10):2892–905. Doi:10.1002/jbm.a.36.124
43. Amorosa LF, Lee CH, Aydemir AB, Nizami S, Hsu A, Patel NR, et al. Physiologic load - bearing characteristics of autografts, allografts, and

- polymer -based scaffolds in a critical sized segmental defect of long bone: an experimental study. *International Journal of Nanomedicine*. 2013; 8:16-37
44. Chachques JC, Herreros J, Trainini JC, Lago N, Díez Solórzano L, Tascón V, et al. Ingeniería tisular y miocardio bioartificial. *Cirugía Cardiovasc*. 2011;18(3):217-24
  45. O'Brien F. *Biomaterials & Scaffolds for tissue engineering*. 2011;14(3) 88-95
  46. 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.
  47. 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.
  48. 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
  49. 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.
  50. 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
  51. Farah A, Anderson D, Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Volume 107, 2016: 367-392
  52. Mohamed OA, Masood SH, Bhowmik JL. Optimization of fused deposition modeling process parameters: a review of current research and prospects. *Adv Manuf*. 2015;3(1):42–53.
  53. Ramot Y, Haim-Zada M, J. Domb A, Nysa A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 107, 2012:153-162.