

Andamios impresos en 3D con poros heterogéneos como estrategia de regeneración ósea *in vivo*[◇]

3D printed scaffolds with heterogeneous porosity as a bone regeneration strategy *in vivo*

Lucía Pérez Sánchez,* Mariana Elizabeth Silva Torres,* Silvia Maldonado Frías,* Rodrigo Correa-Prado,* Eduardo Villarreal-Ramírez,* Francisco Marichi Rodríguez,* Janeth Serrano-Bello*[†]

ABSTRACT: 3D-printed scaffolds with heterogeneous pores emerge as a strategy for tissue regeneration. In this study, bone regeneration was evaluated in critical defects of Wistar rats due to osteoconduction of 3D-printed polylactic acid (PLA) scaffolds with different pore sizes: 250-300 μm in the periphery, followed by 350-400 μm and 400-740 μm in the centre. The small ones promote cell adhesion, while the large ones promote angiogenesis. The scaffolds were 3D printed with PLA, a thermoplastic, biocompatible, and bioresorbable material that has been rigorously approved by the United States Food and Drug Administration (FDA). We evaluated the pore size and porosity *in vivo* in defects of 9 mm in diameter in rat calvaria, calculating the mineralized tissue by the radiodensity of the Hounsfield units (HU) in microtomographic images at 8, 30, 60 and 90 days. The results showed a pore range of 200-800 μm (as the design), and the porosity was 98%, which favored the flow of nutrients, oxygen, and waste elimination. Radiodense tissue was observed *in vivo* on day 30, evidently on day 90, agreeing with the HU 93.66 and 118.31 respectively. The results of this study demonstrate that 3D scaffolds with heterogeneous pores have a significant osteoconductive capacity in bone regeneration. This finding opens new possibilities and alternatives in the field of tissue bioengineering, potentially revolutionizing the way we approach tissue regeneration.

KEYWORDS: scaffolds, 3D printing, heterogeneous porosity, bone regeneration.

RESUMEN: Andamios impresos en 3D con poros heterogéneos, surge como estrategia para la regeneración de tejidos. En este estudio, se evaluó la regeneración ósea en defectos críticos de ratas *Wistar*, debido a la osteoconducción de andamios de poliácido-láctico (PAL), impresos en 3D con diferentes tamaños de poros; 250-300 μm en la periferia, seguido de 350-400 μm y en el centro 400-740 μm , debido a que los pequeños promueven adhesión celular, mientras que los grandes la angiogénesis. Los andamios se imprimieron en 3D con PLA, un material termoplástico, biocompatible, biorreabsorbible, aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), evaluando tamaño de poro y porosidad, *in vivo*, en defectos de 9 mm de diámetro en calvarias de ratas, calculando el tejido mineralizado por la radiodensidad de las unidades Hounsfield (UH) en imágenes microtomográficas a 8, 30, 60 y 90 días. Los resultados demostraron rango de poros de 200-800 μm (como el

Recibido: 13 de abril, 2024.

Aceptado: 17 de junio, 2024.

Publicado: 15 de agosto, 2024.

[◇] Los autores agradecen el apoyo a los proyectos DGAPA-UNAM-PAPIIT-IN218223, IN230220 e IN209123, y el apoyo posdoctoral del Conahcyt.

* Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Odontología, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos.

[†] Autora de correspondencia: janserbello@fo.odonto.unam.mx



diseño), la porosidad fue del 98%, favoreciendo el flujo de nutrientes, oxígeno y eliminación de desechos. Se observó *in vivo* tejido radiodenso al día 30, evidentemente al 90, concordando con las UH 93.66 y 118.31, respectivamente. Los andamios 3D con poros heterogéneos, demostraron su capacidad osteoconductor en la regeneración ósea, abriendo alternativas en la bioingeniería tisular.

PALABRAS CLAVE: andamios, impresión 3D, porosidad heterogénea, regeneración ósea.

Introducción

La regeneración ósea es un desafío significativo en la medicina e ingeniería de tejidos debido a la complejidad en cuanto estructura, composición y función. En lesiones óseas severas es necesario el uso de biomateriales favorecedores de la adhesión, migración y proliferación celular (Chabrand, 2018; Mejía Suaza, Moncada y Ossa-Orozco, 2020). Actualmente, las alternativas de tratamientos se basan en el uso de injertos (autoinjertos, xenoinjertos y aloinjertos), siendo el “estándar de oro” el autoinjerto, pues promueve la osteogénesis; sin embargo, presenta múltiples inconvenientes, entre ellos complicaciones en el sitio donante y en el receptor, aumentando el dolor y la morbilidad del paciente, además de que el tejido óseo es limitado. Por otra parte, el xenoinjerto y aloinjerto pueden presentar el riesgo de rechazo inmunológico, riesgo de transmisión de enfermedades y falta de propiedades osteogénicas (Zhang *et al.*, 2019; Gillman y Jayasuriya, 2021). Por lo tanto, una estrategia prometedora es el diseño de andamios personalizados impresos en 3D, que cumplan de manera anatómica y funcional la jerarquía ósea. La ingeniería de tejidos emplea polímeros biocompatibles para la fabricación de andamios, dentro de estos polímeros destaca el uso de poliácido-láctico (PAL), el cual debido a sus características de contar con propiedades mecánicas favorables, su tasa de degradación, versatilidad de procesamiento y baja toxicidad, es ampliamente utilizado en impresión 3D, específicamente en la técnica de modelado por deposición fundida (MDF) (Subramaniam *et al.*, 2019). La técnica de impresión MDF presenta ventajas en comparación con otras técnicas de fabricación de andamios (lixiviación de partículas, fundición con solvente, espumación con gas, separación de fases y electrohilado), al permitir controlar el tamaño y forma de los poros de manera precisa, además de diseñar andamios exactos con anatomías complejas, dichos diseños se pueden obtener por medio de imágenes médicas a partir de tomografías, resonancias y escaneos (Do *et al.*, 2015). Por lo tanto, en este trabajo se han utilizado las ventajas de la técnica de impresión de andamios 3D de PAL, diseñados con base en una imagen microtomográfica de un defecto en calvaria de rata *Wistar*, dicho andamio cuenta con diferentes tamaños de poro (heterogéneo). Se ha demostrado que los andamios que cumplen con los tamaños de poros heterogéneos han tenido mejor respuesta a nivel celular y tisular, pues funcionan como señales topológicas al permitir una mejor interacción celular, vascularización y remodelación ósea (Bružauskaitė *et al.*, 2016; Abasi *et al.*, 2020; Loh y Choong, 2013).

Por otro lado, como estrategia para la evaluación de la regeneración ósea, se emplea el uso de modelos animales, donde se realizan defectos óseos de tamaño crítico, los cuales debido a su tamaño no se regeneran espontáneamente, necesitando de un sustituto biológico, injerto o andamio, para inducir la formación de tejido, con el objetivo de cumplir con las características morfológicas y funcionales (Liu y Lv, 2018; Diao *et al.*, 2018).

En consecuencia, el objetivo principal de este proyecto fue evaluar la formación de tejido mineralizado, en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas *Wistar*, implantando andamios impresos en 3D de PAL, con poros heterogéneos, utilizando la técnica de impresión MDF.

Método

Diseño e impresión del andamio

A partir de una imagen de microtomografía computarizada (μ CT), la cual fue donada por Pérez Sánchez (Pérez-Sánchez *et al.*, 2021), la cual contaba con un defecto de tamaño crítico de 9 mm de diámetro, por 1 mm de profundidad en la calvaria de una rata *Wistar*, se realizó el diseño de un andamio con poros heterogéneos, de manera graduada, con un rango en la periferia de 250 a 300 μ m, en la zona intermedia 350 a 400 μ m y en el centro 400 a 740 μ m, para lo cual se emplearon los *softwares* Rhino, Mesmixer y 3D Builder.

Para la impresión de los andamios, se utilizó una impresora 3D Mono-price Select Mini, mediante la técnica de modelado por deposición fundida (MDF) capa por capa. Se empleó una punta de extrusión con un diámetro de 200 μ m, a una temperatura de 205 °C, y, como material del andamio, se utilizó un filamento termoplástico de 1kg de poliácido láctico (PLA) marca 3D Market, de 1.75 mm de diámetro.

En total se imprimieron 15 andamios de 9 mm de diámetro por 1 mm de espesor, los cuales contaban con poros heterogéneos; de ellos: 5 fueron para medir el tamaño de poro, 5 para determinar la porosidad y 5 para la respuesta *in vivo*; todos los andamios se esterilizaron a nivel hospitalario con óxido de etileno previo a su uso.

Evaluación de la estructura del andamio

Tamaño de poro

De 5 andamios con poros heterogéneos impresos en 3D, se adquirieron imágenes mediante microscopía electrónica de barrido (ME-JEOL5600LV), en el Laboratorio Central de Microscopía del Instituto de Física de la UNAM, con un voltaje de operación de 25 kV, un aumento de 25x, utilizando electrodos secundarios y retrodispersados. Las muestras fueron preparadas previamente a su observación con un recubrimiento de película delgada de oro. Estas imágenes permitieron evaluar el tamaño de poro utilizando el *software* ImageJ.



Porosidad del andamio

La porosidad de los andamios impresos en 3D se calculó utilizando el principio de Arquímedes en 100 ml de agua desionizada. Como primer paso, se pesó la muestra para determinar su peso seco, posteriormente se sumergió en 100 ml de agua desionizada y se pesó nuevamente para obtener el peso aparente. Se calculó el volumen de la muestra sumergida utilizando la diferencia entre los pesos en seco y aparente, se calculó el volumen de sólidos de la muestra restando el volumen de poros del volumen total de la muestra. Finalmente, se calculó la porosidad dividiendo el volumen de poros entre el volumen total de la muestra y se multiplicó por 100 para obtener un porcentaje.

A continuación, se describe la fórmula:

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

W_{sat} = andamio saturado de agua.

W_{dry} = andamio seco.

W_{sus} = andamio suspendido en agua.

Modelo animal

Se calculó el número de animales correspondiente al valor de la desviación estándar con $Z\alpha$ (Z de alfa), que refiere al error tipo I (nivel de confianza $\alpha = 0.05$ que corresponde a un valor de $Z = 1.96$), y $Z\beta$ (Z de beta) con una potencia de 80% (valor de $Z = 0.84$) dando como resultado 5 ratas.

Para evaluar si el andamio impreso en 3D con poros heterogéneos es osteoconductor, se utilizó un modelo estandarizado de defecto de tamaño crítico en la calvaria de ratas *Wistar*, machos de 250 g. Las ratas se alojaron en el bioterio de la Facultad de Odontología de la UNAM, en condiciones controladas de temperatura a 24 °C y humedad del 50%, con un fotoperiodo de luz/oscuridad de 12 horas. La alimentación fue con nutricubo y agua *ad libitum*.

Los procedimientos quirúrgicos siguieron las normas establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO1999, así como las directrices del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) aprobado con número FO-M001-0006-2021.

El procedimiento quirúrgico se realizó por una persona experta; las ratas se sedaron y anestesiaron con Xilacina (10 mg/kg) por vía intramuscular y se administró Isoflurano al 2% por inhalación mediante un vaporizador a bajo flujo. Posteriormente, se rasuró la zona quirúrgica (calvaria) y se aplicó un antiséptico (Estericide), a continuación se realizó una incisión lineal en la calota y se separó el tejido hasta el vértice craneal.

Con una trefina de 9 mm de diámetro a 4,000 revoluciones por minuto (rpm), se delimitó el defecto de tamaño crítico en la zona media del hueso frontal, irrigando de manera constante con una solución amortiguadora estéril de fosfato de sodio, cloruro de sodio y fosfato de potasio (PBS). Posteriormente, con un cincel periodontal Ochsenshein 1, se separó la porción de

hueso con sumo cuidado. En el sitio del defecto generado se colocaron los andamios impresos 3D y se afrontó el tejido, el cual se suturó con ácido poliglicólico de 4-0.

Posterior al acto quirúrgico, se realizó un seguimiento clínico durante el tiempo que duró el estudio, observando diferentes parámetros tales como comportamiento, aspecto de la zona quirúrgica, cambio de peso, aspecto del pelaje, ojos y vibrisas.

Evaluación de la formación de tejido novo por medio de imágenes microtomográficas

Para evaluar la formación de tejido radiodenso en la zona del defecto, se adquirieron imágenes microtomográficas por medio de un microtomógrafo Albira ARS, Oncovision, ubicado en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) en el laboratorio de Física Médica, las imágenes se tomaron a las 5 ratas a los 8, 30, 60 y 90 días posteriores a la implantación de los andamios, con campo de visión en la cabeza del animal, una magnitud de corriente de 0.4 miliamperes (mA) y un voltaje de 35 kilovoltios (kV).

Evaluación de las unidades Hounsfield (UH)

Para calcular la atenuación de los rayos X en la zona del defecto y poder determinar la radiodensidad del mismo, se evaluaron las unidades Hounsfield, en imágenes procesadas previamente en el software OsiriX MD, con un ancho y nivel de ventana de imagen para visualizar tejido duro y músculo (WLWW CT-Bone), en dichas imágenes se marcaron regiones de interés (ROI) con un área de 1,000 píxeles cuadrados, en el hueso nativo (control), en la zona donde se colocó el andamio y en el tejido neoformado (tejido *novo*).

Análisis estadístico

Los resultados de las unidades Hounsfield fueron analizados estadísticamente por ANOVA de dos vías, con prueba Post Hoc Tukey, con una $p \leq 0.05$ de significancia.

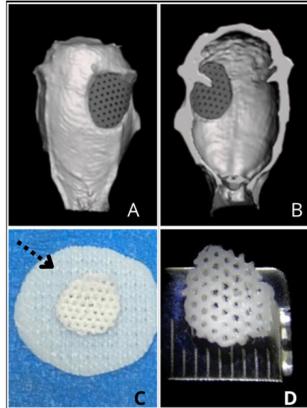
Resultados

Diseño e impresión del andamio

El diseño del andamio fue al tamaño exacto del defecto, como se observa en las figuras 1A y 1B, respetando la anatomía del mismo tanto en una vista frontal (concavidad), como interna (convexidad), una vez diseñado con el tamaño, forma y poros heterogéneos, se imprimió el andamio con material de adhesión a la cama (figura 1C) con la finalidad de que no se desprendiera de la cama de impresión al ser un objeto pequeño.

En el andamio, ya sin el material de adhesión, se evidencia clínicamente que la superficie tiene diferentes tamaños de poro (figura 1D).

FIGURA 1. Diseño e impresión del andamio con poros heterogéneos.



A) Se observa la adaptación exacta del andamio al defecto en una vista frontal (*software MeshMixer*); B) vista interna del andamio adaptado al defecto; C) andamio impreso con material de adhesión (flecha negra), y, D) andamio sin material de adhesión, con diferentes tamaños de poro.

Fuente: Elaboración de los autores.

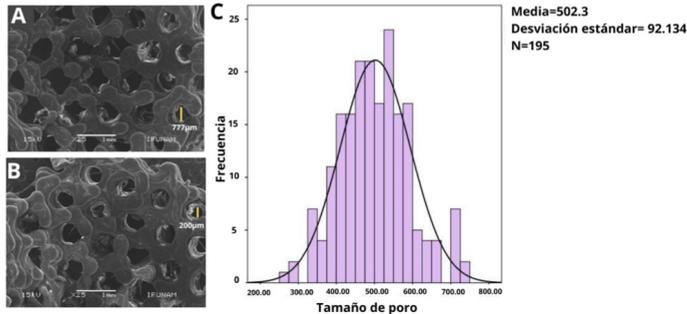
Evaluación de la estructura del andamio

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) muestran que los andamios tienen una estructura superficial con poros bien definidos y de diferente tamaño, en el centro se encuentran poros con un diámetro de 700-800 μm (figura 2A), en comparación con los poros que están en los bordes, los cuales miden de 200-300 μm (figura 2B). En el histograma (figura 2C) se observa la distribución de los diferentes tamaños de poros que va desde los 200 μm a los 800 μm , con una media de 502.3 μm y una desviación estándar de 92.134, con una N de 195 poros. Dichas medidas confirman que la distribución del tamaño de poros de los andamios impresos coincide con la de los tamaños de poros del diseño por computadora, permitiendo comprobar que la técnica MDF de impresión 3D, imprime diferentes tamaños de poro en todas sus capas. Por otro lado, la porosidad fue medida de acuerdo con el principio de Arquímedes, la cual dio como resultado 98% de porosidad favoreciendo la vascularización, la difusión de nutrientes y oxígeno.

Evaluación de la formación de tejido *novo* por medio de imágenes microtomográficas

En la figura 3 se pueden observar imágenes microtomográficas representativas de la formación de tejido *novo* dentro del defecto óseo, evaluadas a diferentes tiempos 8, 30, 60 y 90 días. La figura 3A corresponde a los 8 días de evaluación, donde se puede apreciar que no hay formación de tejido *novo* dentro del defecto óseo, con una radiodensidad diferente al hueso nativo; la figura 3B co-

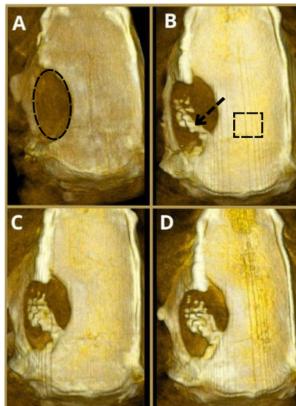
FIGURA 2. Evaluación de la estructura del andamio.



A) corresponde a la zona del centro del andamio con un tamaño de poro aproximado de 777 μm (señalado con una línea amarilla); B) a la zona del borde con un tamaño de poro aproximado de 200 μm (línea amarilla), y, C) es el histograma de distribución de tamaños de poros, donde el rango de tamaño de poro va entre 200 μm -800 μm .
Fuente: Elaboración de los autores.

responde al día 30 de evaluación, donde se observa la formación de tejido *novo* dentro del defecto, que va desde la periferia hasta la parte central del mismo (en forma de puente); la figura 3C, al día 60, donde se hace evidente el aumento en la cantidad de tejido *novo*, sobre todo en la zona central del defecto, con una radiodensidad semejante a la del hueso nativo, y, la figura 3D, al día 90, donde hay un aumento en la cantidad de tejido *novo* en comparación con el día 60, acercándose la formación del tejido al otro extremo del defecto óseo.

FIGURA 3. Evaluación de la formación de tejido *novo*.



A) Día 8 de evaluación, se puede observar que no hay formación de tejido *novo*, dentro del defecto óseo, el cual se delimita con el contorno ovalado punteado; B) día 30 de evaluación, se observa tejido *novo* (flecha negra), con una radiodensidad similar al tejido nativo (contorno cuadrado); C) día 60, aumentó el tejido dentro del defecto en comparación con el día 30, y, D) día 90, se observa un aumento en la cantidad de tejido *novo*, aproxima los extremos del defecto óseo.
Fuente: Elaboración de los autores.

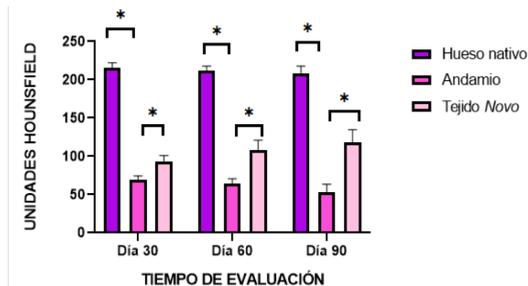
Evaluación de las unidades Hounsfield (UH)

Se evaluaron las unidades Hounsfield (UH) de tres tejidos diferentes, el tejido nativo, el tejido *novo* y el andamio. En la figura 4 se observa una gráfica donde en el eje X se presentan los diferentes tiempos en los cuales se llevó a cabo la evaluación, 30, 60 y 90, únicamente, debido a que en el día 8 no hubo presencia de tejido en la zona del defecto.

A partir del día 30 se aprecia que el hueso nativo presentó un valor promedio de 215.25 ± 6.0 UH mayor en comparación con el andamio 69.5825 ± 4.2 UH y el tejido *novo* 93.66 ± 6.5 UH, presentando diferencia significativa entre los tres tejidos.

En el día 60, sin embargo, se hace evidente un aumento del valor en el tejido *novo* a 108.74 ± 10.6 UH, en comparación con el día 30. En el día 90 se observa que el tejido nativo y el andamio no tuvieron diferencias en sus valores de UH, en comparación con los días anteriores de evaluación; por otro lado, el tejido *novo* tuvo un aumento de sus valores a 118.3 ± 14.22 UH en comparación con los días 30 y 60. Por lo tanto, este aumento en los valores en UH del tejido *novo* al llegar a los 90 días confirma que lo observado dentro del defecto es un tejido en proceso de mineralización, el cual aumenta conforme pasan los días, lo cual comprueba haberse logrado con éxito la función de osteoconducción del andamio

FIGURA 4. Evaluación de las unidades Hounsfield de tres tejidos diferentes.



En el día 30 se aprecia que el tejido nativo, el andamio y el tejido *novo* presentan diferencias estadísticas entre ellos. En el día 60, se hace evidente un aumento del valor de UH en el tejido *novo*, en comparación con el día 30. En el día 90 se observa un incremento de las UH del tejido *novo*, en comparación con el día 30 y 60, presentando diferencias estadísticas entre el andamio y el tejido nativo. Fuente: Elaboración de los autores.

Discusión

En la bioingeniería de tejidos ha sido fundamental la implementación del uso de nuevos materiales, así como de nuevas técnicas que permitan fabricar sustitutos biológicos o andamios, con el objetivo de mantener, reparar y regenerar tejido perdido o dañado por diferentes circunstancias. Una de estas técnicas in-

novadoras con un crecimiento acelerado en los últimos años es la impresión 3D, pues ha sido una herramienta sumamente útil no solo para el área odontológica, sino para todas las relacionadas con la salud, dando así oportunidad de implementar esta tecnología en la planificación de tratamientos quirúrgicos, implantes médicos, prótesis y ortesis personalizadas, entre otros, para hacer de estas una opción más segura para los pacientes (Kantaros, 2022).

En la impresión 3D, la técnica modelado por deposición fundida (MDF) consiste en ir depositando material capa por capa con el fin de fabricar objetos complejos en su diseño, por ejemplo modelos anatómicos completos o solo porciones de ello, aditamentos para cirugías y fabricación de andamios para la regeneración ósea (Su, Wang y Guo, 2021), así como los diseñados en este estudio. Esta técnica se eligió debido a su disponibilidad en el uso de diversos *softwares*, y por presentar un costo asequible para el paciente.

Es por ello que en el presente trabajo nos enfocamos en el uso de la tecnología de impresión 3D, y el uso de biopolímeros para la impresión de andamios pensados especialmente para defectos de tamaño crítico en zonas maxilofaciales, donde es imperante el suministro de nutrientes, oxígeno, eliminación de desechos metabólicos y promoción de la osteogénesis.

Por lo cual se diseñó un andamio de 9 mm de diámetro por 1 de espesor, con poros de mayor calibre en el centro del defecto, pues es la zona más difícil de llevar nutrientes por la baja vascularización que posee, en la periferia se distribuyeron poros de menor calibre al ser más cercana al tejido nativo y con mejora de la cantidad de nutrientes. Existen diversos estudios indicando que un tamaño de poro de 500 μm – 1000 μm favorece la regeneración de tejido óseo en modelos *in vivo* (Van Bael *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013; Bauermeister, Zuriarrain y Newman, 2016); no obstante, en la investigación de Chung y King (2011) se menciona que aún no se ha dado un tamaño de poro óptimo para la mejor y mayor regeneración ósea, tanto en su forma como en su mineralización (Chung y King, 2011) debido a que el rango es muy amplio de 100 μm -1000 μm . Asimismo, en este trabajo se obtuvieron tamaños de poros encontrándose estos entre 200 μm a las 800 μm , los cuales se hallan dentro de los rangos reportados para la regeneración ósea.

Existen trabajos como los de Prasopthum *et al.* (2019), quienes fabricaron andamios 3D con diferentes tamaños de poros (macro/nanoporos) sin la adición de algún factor soluble, cuyos resultados comprobaron que únicamente la topografía del andamio puede influir en la adhesión, morfología e inclusive diferenciación celular de las células troncales mesenquimales a linaje óseo o condrogénico (Prasopthum *et al.*, 2019; Sultan y Mathew, 2018), coincidiendo con los resultados de este trabajo donde la topografía (poros heterogénea) del andamio, influyó en su función osteoconductiva, sin necesidad de adicionar algún factor de crecimiento o células.

Por otro lado, en este proyecto, se utilizó el biopolímero de PAL porque es producido a partir del ácido láctico, un producto natural, obtenido por fermentación de fuentes renovables. Dicho material ha sido utilizado con anterioridad

por su gran cualidad de ser biodegradable, biocompatible y biorreabsorbible, utilizándose para implantes ortopédicos, como placas o tornillos para el tratamiento de fracturas. Saini y cols. mencionan el uso de PAL como una alternativa óptima en la fabricación de andamios, por sus propiedades térmicas al favorecer el uso de diferentes técnicas, las cuales permiten estructuras con alta definición pudiendo llegar a imitar las condiciones de la matriz extracelular (MEC), también es más accesible para su manufactura y es un factor importante en el momento de su selección (Saini, Arora y Kumar, 2016; Taib *et al.*, 2023).

Los andamios de PAL impresos en 3D se implantaron en un modelo óseo *in vivo* donde se realizó un defecto de tamaño crítico en la calvaria de las ratas macho de la cepa *Wistar*, en la zona de los huesos temporal y parietal, dándonos una zona compleja para adosar el andamio; sin embargo, se logró obtener de manera precisa la forma de dicha zona consiguiendo un sellado periférico favorable, debido a haberse diseñado el andamio al tamaño y forma del defecto, con base en una imagen microtomográfica. Existen diversos estudios, donde utilizan andamios impresos en 3D con diferentes polímeros termoplásticos, implantados en defectos de tamaño crítico en calvarias de ratas *Wistar*, sin embargo, los defectos suelen hacerse sobre los huesos parietales a un tamaño de 5 mm de diámetro, o en el centro de la calvaria atravesando la sutura sagital, en ambos casos los defectos son planos, limitando la posibilidad de crear andamios personalizados, como se utilizó en este trabajo (Gaihre *et al.*, 2024; Cai *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2022).

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

Después del término de la evaluación por imágenes microtomográficas, se observan resultados favorables al existir de manera contundente la formación de tejido radiodenso (mineralizado) en los días 30, 60 y 90, siendo esta última etapa donde se mostró de manera más visible la cantidad del mismo.

Por esta razón, la obtención de andamios impresos en 3D con poros heterogénea puede ser prometedora en el área clínica para una mejor osteoconducción en defectos de tamaño crítico y, además, reducir el tiempo quirúrgico y riesgos en las cirugías; pues diferentes estudios mencionan que el uso de modelos impresos en 3D permite reducir el riesgo de complicaciones, así como disminuir los tiempos de cirugía al permitir que el cirujano planifique y practique el procedimiento antes de la intervención (Huang *et al.*, 2016; Hidalgo, Romo y Estolano, 2009). En este proyecto de investigación, el andamio impreso en 3D con poros heterogéneos dio resultados favorables para la osteoconducción en defectos de tamaño crítico en calvarias de rata *Wistar* observándose claramente en las imágenes microtomográficas; posteriormente, se midieron las UH (una medida de la densidad radiológica), por lo tanto, entre más alto sea el valor UH mayor densidad tiene el tejido, este conocimiento permitió predecir que el tejido *novo* observado dentro de los defectos óseos está en proceso de mineralización, debido

a coincidir con el aumento en los valores de UH (mayor densidad) en el tejido *novo* al llegar al día 90. Es importante mencionar la necesidad de realizar más estudios histológicos para poder corroborar que el tejido *novo* es hueso, como lo presentan en su estudio Shanbhag y cols., donde se evaluó la formación de tejido dentro del defecto óseo por medio de imágenes microtomográficas y confirmaron que era hueso usando la tinción de Levi-Laczko, la cual permite visualizar el tejido óseo maduro en muestras histológicas (Shanbhag *et al.*, 2021).

Del mismo modo, es importante destacar que los resultados de este trabajo son relevantes y tienen aplicaciones prometedoras en la ingeniería de tejidos óseo al permitir comprobar que el diseño del andamio con sus poros heterogéneos juega un papel crucial en la respuesta de regeneración *in vivo*, y el uso de la impresión 3D incluye la posibilidad de personalizar los tratamientos de regeneración en los defectos óseos.

Conclusión

La impresión del andamio 3D de PLA con poros heterogéneos cumple con la función de osteconducción al generar tejido en proceso de mineralización, con una radiodensidad similar al tejido nativo observado en imágenes microtomográficas dentro de los defectos de tamaño crítico, y al aumentar los valores de UH a los 90 días, comprobando que los tamaños de poro diferentes en un andamio juegan un papel importante en la respuesta de regeneración *in vivo*. Siendo una propuesta de aplicación prometedora en la ingeniería de tejidos óseos.

Contribución de autorías

Lucía Pérez Sánchez. Responsable de texto debido a su experiencia metodológica, participó en el diseño e impresión del andamio, así como en el procedimiento quirúrgico de los animales de experimentación, discusión y análisis de resultados.

Mariana Elizabeth Silva Torres. Alumna de licenciatura, recopilación de información y escritura del texto, trabajo con el cual obtuvo su grado académico.

Silvia Maldonado Frías. Contribución en el análisis de las Unidades Hounsfield, recopilación y análisis de datos, miembro del comité tutorial de Mariana Elizabeth Silva Torres.

Rodrigo Correa-Prado. Posdoctorante del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, quien analizó de la estructura superficial del andamio por medio de microscopía electrónica de barrido, así como recopilación de datos.

Eduardo Villarreal-Ramírez. Revisión y corrección del manuscrito.

Francisco Marichi Rodríguez. Contribución en la adquisición de imágenes microtomográficas y recolección de datos.

Janeth Serrano-Bello. Contribución en el diseño de la metodología, procedimiento quirúrgico en animales de experimentación, elaboración de figuras, discusión y análisis de resultados.

Referencias

- Abbasi, Naghme, Stephen Hamlet, Robert M. Love y Nam Trung Nguyen. (2020). Porous scaffolds for bone regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 5(1): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.01.007>.
- Bauermeister, Adam J, Alexander Zuriarrain y Martin I. Newman. (2016). Three-dimensional printing in plastic and reconstructive surgery. *Annals of Plastic Surgery*, 77(5): 569-76. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000000671>.
- Bružauskaitė, Ieva, Daiva Bironaitė, Edvardas Bagdonas y Eiva Bernotienė. (2016). Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes – different cell effects. *Cytotechnology*, 68 (3): 355-69. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9895-4>.
- Cai, Zhongyu, Yong Wan, Matthew L. Becker, Yun-Ze Long y David Dean. (2019). Poly(propylene fumarate)-based materials: synthesis, functionalization, properties, device fabrication and biomedical applications. *Biomaterials*, 208: 45-71, julio. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.03.038>.
- Chabrand, P. (2018). Biomecánica del tejido óseo. *EMC – Aparato Locomotor*, 51(3): 1-8. [https://doi.org/10.1016/S1286-935X\(18\)92752-8](https://doi.org/10.1016/S1286-935X(18)92752-8).
- Chung, Sangwon y Martin W. King. (2011). Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 58(6): 423-38. <https://doi.org/10.1002/bab.60>.
- Diao, Jingjing, Jun OuYang, Ting Deng, Xiao Liu, Yanting Feng, Naru Zhao, Chuanbin Mao y Yingjun Wang. (2018). 3D-plotted beta-tricalcium phosphate scaffolds with smaller pore sizes improve *in vivo* bone regeneration and biomechanical properties in a critical-sized calvarial defect rat model. *Advanced Healthcare Materials*, 7(17). <https://doi.org/10.1002/adhm.201800441>.
- Do, Anh-Vu, Behnoush Khorsand, Sean M. Geary y Aliasger K. Salem. (2015). 3D printing of scaffolds for tissue regeneration applications. *Advanced Healthcare Materials*, 4(12): 1742-62. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500168>.
- Gaihre, Bipin, Maria D. Astudillo Potes, Xifeng Liu, Maryam Tilton, Emily Camilleri, Asghar Rezaei, Vitalii Serdiuk *et al.* (2024). Extrusion 3D-printing and characterization of poly(caprolactone fumarate) for bone regeneration applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 112(5): 672-84. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37646>.
- Gillman, Cassidy E. y Ambalangodage C. Jayasuriya. (2021). FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 130:112466, noviembre. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112466>.
- Hidalgo, Héctor Malagón, Gabriela Wong Romo y Roberto Takeo Rivera Estolano. (2009). Stereolithography. *Journal of Craniofacial Surgery*, 20(5): 1473-77. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e3181b09a70>.
- Huang, Yu-Hui, Rosemary Seelaus, Linping Zhao, Pravin K Patel y Mimis Cohen. (2016). Virtual surgical planning and 3D printing in prosthetic orbital reconstruction with percutaneous implants: a technical case report. *International Medical Case Reports Journal*, 9:341-45, noviembre. <https://doi.org/10.2147/IMCRJ.S118139>.

- Kantaros, Antreas. (2022). 3D printing in regenerative medicine: technologies and resources utilized. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23): 14621. <https://doi.org/10.3390/ijms232314621>.
- Liu, Mengying y Yonggang Lv. (2018). Reconstructing bone with natural bone graft: a review of *in vivo* studies in bone defect animal model. *Nanomaterials*, 8(12): 999. <https://doi.org/10.3390/nano8120999>.
- Loh, Qiu Li y Cleo Choong. 2013. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(6): 485-502. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437>.
- Mejía Suaza, Mónica Liliana, María Elena Moncada y Claudia Patricia Ossa-Orozco. (2020). Characterization of electrospun silk fibroin scaffolds for bone tissue engineering: a review. *Tecnológicas*, 23(49): 33-51. <https://doi.org/10.22430/22565337.1573>.
- Pérez-Sánchez, Lucía, Misael Aaron Ortiz de la O., Patricia González-Alva, Luis Alberto Medina, David Masuoka-Ito, Marco Antonio Álvarez-Pérez y Janeth Serrano-Bello. (2021). *In vivo* study on bone response to 3D-printed constructs designed from microtomographic images. *Journal of Materials Engineering and Performance*, 30(7): 5005-12. <https://doi.org/10.1007/s11665-021-05585-8>.
- Prasopthum, Aruna, Mick Cooper, Kevin M. Shakesheff y Jing Yang. (2019). Three-dimensional printed scaffolds with controlled micro-/nanoporous surface topography direct chondrogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(21): 18896-906. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b01472>.
- Qin, Wen, Chenkai Li, Chun Liu, Siyu Wu, Jun Liu, Jiayi Ma, Wenyang Chen, Hongbin Zhao y Xiubo Zhao. (2022). 3D printed biocompatible graphene oxide, attapulgite, and collagen composite scaffolds for bone regeneration. *Journal of Biomaterials Applications*, 3(10): 1838-51. <https://doi.org/10.1177/08853282211067646>.
- Saini, P., M. Arora y M. N. V. Ravi Kumar. (2016). "Oly(lactic acid) blends in biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107: 47-59, diciembre. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.014>.
- Shanbhag, Siddharth, Salwa Suliman, Samih Mohamed-Ahmed, Carina Kamplaitner, Mohamed Nageeb Hassan, Patrick Heimel, Toni Dobsak, Stefan Tangl, Anne Isine Bolstad y Kamal Mustafa. (2021). Bone regeneration in rat calvarial defects using dissociated or spheroid mesenchymal stromal cells in scaffold-hydrogel constructs. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1): 575. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02642-w>.
- Su, Xin, Ting Wang y Shu Guo. (2021). Applications of 3D printed bone tissue engineering scaffolds in the stem cell field. *Regenerative Therapy*, 16: 63-72, marzo. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.01.007>.
- Subramaniam, S. R., M. Samykano, S. K. Selvamani, W. K. Ngui, K. Kadirgama, K. Sudhakar y M. S. Idris. (2019). 3D printing: overview of PLA progress. 020015. <https://doi.org/10.1063/1.5085958>.
- Sultan, Sahar y Aji P. Mathew. (2018). 3D printed scaffolds with gradient porosity based on a cellulose nanocrystal hydrogel. *Nanoscale*, 10(9): 4421-31. <https://doi.org/10.1039/C7NR08966J>.

- Taib, Nur-Azzah Affah Binti, Md Rezaur Rahman, Durul Huda, Kuok King Kuok, Sinin Hamdan, Muhammad Khusairy Bin Bakri, Muhammad Rafiq Mirza Bin Julaihi y Afrasyab Khan. (2023). A review on poly lactic acid (PLA) as a biodegradable polymer. *Polymer Bulletin*, 80(2): 1179-1213. <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04160-y>.
- Van, Bael, S, Y.C. Chai, S. Truscillo, M. Moesen, G. Kerckhofs, H. Van Oosterwyck, J.-P. Kruth y J. Schrooten. (2012). The effect of pore geometry on the *in vitro* biological behavior of human periosteum-derived cells seeded on selective laser-melted Ti6Al4V bone scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 8(7): 2824-34. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.04.001>.
- Wu, Jiang, Jian Zhou, Wen Zhao y Bo Gao. (2013). Evaluation of the bond strength of a low-fusing porcelain to cast Ti-24Nb-4Zr-7.9Sn aAlloy. *Materials Science and Engineering: C*, 33(1): 140-44. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.08.020>.
- Zhang, Lei, Guojing Yang, Blake N. Johnson y Xiaofeng Jia. (2019). Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomaterialia*, 84: 16-33, enero. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.039>.