



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Maestría en Investigación Biomédica

**Diseño de un filamento osteoinductor compuesto  
para cultivo de osteoblastos.**

Tesis presentada por:

**BIÓL. ANDRÉS DANIEL MENDOZA MEYMAR**

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

Tutor: Dr. David Masuoka Ito

Cotutor: Dr. Vicente Esparza Villalpando

Asesor: Dr. Ricardo Ernesto Ramírez Orozco

México, Aguascalientes. Julio 2022



DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 13/05/22

NOMBRE: ANDRÉS DANIEL MENDOZA MEYMAR ID 177230

PROGRAMA: MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA LGAC (del posgrado): BIOMEDICINA MOLECULAR Y CELULAR

TIPO DE TRABAJO: ( X ) Tesis ( ) Trabajo Práctico

TÍTULO: DISEÑO DE UN FILAMENTO OSTEINDUCTOR COMPUESTO PARA CULTIVO DE OSTEÓBLASTOS

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Esta tesis genera conocimiento sobre el diseño de tecnología de menor valor económico con la misma eficiencia que las técnicas tradicionales y que son de mayor costo de cultivo celular.

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>				
SI				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>				
SI				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI				Cuenta con los votos a probatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
SI				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI				Coincide con el título y objetivo registrado
SI				Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
No				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</i>				
N.A.				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
N.A.				El estudiante es el primer autor
N.A.				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
N.A.				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
N.A.				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
N.A.				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado: Si  No

FIRMAS

Elaboró:   
 \* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN: DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO   
 NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: DR. SUBTERRANEO BARBA GALLARDO   
 \* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano   
 Revisó: DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO   
 NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:   
 Autorizó: DRA. PAULINA ANDRADE LOZANO   
 NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado   
 En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico. Llevar el seguimiento de los alumnos.

CARTA DE VOTO APROBATORIO  
COMITÉ TUTORAL

DRA. PAULINA ANDRADE LOZANO  
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**PRESENTE**

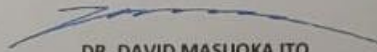
Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado de la estudiante **ANDRÉS DANIEL MENDOZA MEYMAR** con ID 177230 quien realizó la tesis titulada: **DISEÑO DE UN FILAMENTO OSTEOCONDUCTOR COMPUESTO PARA CULTIVO DE OSTEOBLASTOS**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

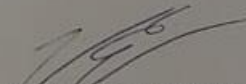
**ATENTAMENTE**

*"Se Lumen Proferre"*

Aguascalientes, Ags., a 03 de mayo de 2022



DR. DAVID MASUOKA ITO  
Tutor de tesis



DR. VICENTE ESPARZA VILLALPANDO  
Co-Tutor de tesis



DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO  
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborada por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16  
Actualización: 00  
Emisión: 17/05/19

23/5/22, 13:17

Gmail - Manuscript submitted to Journal of Biomedical Materials Research: Part A - JBMR-A-22-0228, Author's Copy



Andrés Mendoza <andresmendoza9376@gmail.com>

## Manuscript submitted to Journal of Biomedical Materials Research: Part A - JBMR-A-22-0228, Author's Copy

1 mensaje

**JBMR-A Editorial** <onbehalf@manuscriptcentral.com>

12 de mayo de 2022, 11:16

Responder a: jbmra@wiley.com

Para: david.masuoka@gmail.com

Cc: andresmendoza9376@gmail.com, vicente.med@outlook.com, ricardoe.ramirez@edu.uaa.mx, matdent2014@gmail.com, bryan.mctellez@gmail.com, david.masuoka@gmail.com

12-May-2022

Manuscript number: JBMR-A-22-0228

Dear Dr. Masuoka-Ito:

We are pleased to receive your manuscript entitled Novel Chemical synthesis and characterization of a composite filament of PLA/ $\beta$ -TCP for 3D printing. by Mendoza-Meymar, Andrés ; Esparza-Villalpando, Vicente; Ramírez-Orozco, Ricardo; Barrera-Bernal, José; Martín Del Campo Tellez, Bryan; Masuoka-Ito, David. We will be sending it out for review shortly.

To track the progress of your manuscript through the editorial process using our new web-based system, simply point your browser to:

<https://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-a>

and log in using the following user ID and password:

(User ID): [david.masuoka@gmail.com](mailto:david.masuoka@gmail.com)

(Password): If you do not remember your password, please click on this link to set a new password

[https://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-a?URL\\_MASK=78e88469ff4a4baca68c438084c6b1c2](https://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-a?URL_MASK=78e88469ff4a4baca68c438084c6b1c2)

Please note that the single use link will expire on 15-May-2022 4:16:41 PM GMT / 15-May-2022 12:16:41 PM EDT.

If the single use link has expired, you can generate a single use password by entering your email address into the Password Help function on your site log in page: <https://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-a>

If you should have any specific deadlines directly related to this manuscript, please let us know as soon as possible.

Please remember in any future correspondence regarding this article to always include its manuscript ID number JBMR-A-22-0228.

This journal offers a number of license options, information about this is available here: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing/index.html>. All co-authors are required to confirm that they have the necessary rights to grant in the submission, including in light of each co-author's funder policies. For example, if you or one of your co-authors received funding from a member of Coalition S, you may need to check which licenses you are able to sign.

If you experience problems associated with the submission web site, please contact the Scholarone support staff directly using the Get Help Now link in the top right corner of the website.

Many thanks for submitting your manuscript.

Sincerely,  
Journal of Biomedical Materials Research: Part A Editorial Office

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=4e5e91776f&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1732637835033415926&siml=msg-f%3A1732637835033415926&siml=msg-f%3A1732637835033415926> 1/1

Primero que nada, quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por su continuo apoyo durante los últimos dos años de mi formación profesional “*Se lumen proferre*”.

En segundo lugar, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia por haber participado activamente en la concretización de mi grado d

A mis tutores, por su apoyo durante todo el desarrollo de la tesis y por su acompañamiento en mi formación como profesionista.

Y, por último, pero definitivamente en primer lugar de importancia, a mis padres. Sin ellos nada de esto hubiera pasado, les debo mi vida y mi alma, mi futuro es gracias a ustedes.

***I amar prestar aen.***

***Han mathon ne nen.***

***Han mathon ne chae.***

***A han noston ned wilith.***



Índice de contenido

**Resumen ----- pág. 006**

**Abstract ----- pág. 007**

**Antecedentes ----- pág. 008**

**Generalidades del sistema esquelético ----- pág. 008**

Hueso ----- pág. 008

**Biología celular selecta ----- pág. 008**

Osteoblastos ----- pág. 008

**Medicina regenerativa ----- pág. 009**

Andamios celulares ----- pág. 009

Biocompatibilidad ----- pág. 010

Andamios celulares para reparación ósea ----- pág. 010

Osteoinducción ----- pág. 011

**Biomateriales ----- pág. 011**

Biopolímeros ----- pág. 011

Ácido poliláctico ----- pág. 012

Biominales ----- pág. 012

Fosfato Tricálcico beta ----- pág. 012

**Planteamiento del problema ----- pág. 013**

**Objetivo general ----- pág. 013**

Objetivos específicos: ----- pág. 013

**Hipótesis de trabajo ----- pág. 014**

**Tipo de estudio y diseño general ----- pág. 014**

**Variables dependientes ----- pág. 014**

**Variables independientes ----- pág. 014**

**Recolección de la información ----- pág. 014**

**Consideraciones éticas ----- pág. 014**

**Análisis estadísticos ----- pág. 015**

Estadística descriptiva ----- pág. 015

<u>Estadística inferencial -----</u>	<u>pág. 015</u>
<u>Metodología -----</u>	<u>pág. 015</u>
<u>Síntesis de filamento compuesto -----</u>	<u>pág. 015</u>
<u>Impresión de andamio -----</u>	<u>pág. 016</u>
<u>Caracterización superficial -----</u>	<u>pág. 016</u>
<u>Espectroscopía infrarroja -----</u>	<u>pág. 016</u>
<u>Interacción osteoblasto-andamio -----</u>	<u>pág. 016</u>
<u>Viabilidad celular -----</u>	<u>pág. 017</u>
<u>Resultados -----</u>	<u>pág. 017</u>
<u>Síntesis de filamento compuesto -----</u>	<u>pág. 017</u>
<u>Impresión de andamio -----</u>	<u>pág. 019</u>
<u>Caracterización superficial -----</u>	<u>pág. 020</u>
<u>Espectroscopía infrarroja -----</u>	<u>pág. 021</u>
<u>Interacción osteoblasto-andamio -----</u>	<u>pág. 023</u>
<u>Viabilidad celular -----</u>	<u>pág. 025</u>
<u>Discusión -----</u>	<u>pág. 026</u>
<u>Conclusiones -----</u>	<u>pág. 029</u>
<u>Bibliografía -----</u>	<u>pág. 029</u>

Índice de tablas

*Tabla 1 (Viabilidad celular de los grupos de experimentación a 7, 14 y 21 días)*

----- *pág. 025*

*Tabla 2 (Análisis de varianza de los grupos de experimentación )* -----

----- *pág. 026*





Índice de ilustraciones

*Ilustración 1 (Diagrama de la colocación de muestras en las cajas de 96 pozos)*  
----- *pág. 016*

*Ilustración 2 (Materiales crudos)* ----- *pág. 018*

*Ilustración 3 (Etapa de mezclado de los materiales)* -----  
----- *pág. 018*

*Ilustración 4 (Evaporación del solvente y concentración de mezcla)* -----  
----- *pág. 018*

*Ilustración 5 (Filamentos formados)* ----- *pág. 018*

*Ilustración 6 (Molde usado para la formación de filamentos)* -----  
----- *pág. 019*

*Ilustración 7 (Impresora 3D usada {TronXY® XY-100})* ----- *pág. 019*

*Ilustración 8 (Andamios impresos)* ----- *pág. 019*

*Ilustración 9 (Fotografía estereoscópica de un andamio {vista superior})* -----  
----- *pág. 019*

*Ilustración 10 (Fotografía estereoscópica de un andamio {vista inferior})* -----  
----- *pág. 019*

*Ilustración 11 (Microfotografía (500X) de un andamio de PLA puro)* -----  
----- *pág. 020*

*Ilustración 12 (Microfotografía (1500X) de un andamio de PLA puro)* -----  
----- *pág. 020*

*Ilustración 13 (Microfotografía (500X) de un andamio de 15% b-TCP y 85% PLA)* ----- *pág. 020*

*Ilustración 14 (Microfotografía (1500X) de un andamio de 15% b-TCP y 85% PLA)* ----- *pág. 020*

*Ilustración 15 (Microfotografía (500X) de un andamio de 20% b-TCP y 80% PLA)* ----- *pág. 021*

*Ilustración 16 (Microfotografía (1500X) de un andamio de 20% b-TCP y 80% PLA)* ----- *pág. 021*

*Ilustración 17 (Espectro de FTIR obtenido para los materiales puros y los andamios impresos) ----- pág. 022*

*Ilustración 18 (Osteoblastos fetales a una semana de experimentación {sin andamio}) ----- pág. 024*

*Ilustración 19 (Osteoblastos fetales a una semana de experimentación {con andamio}) ----- pág. 024*

*Ilustración 20 (Osteoblastos fetales a dos semanas de experimentación {sin andamio}) ----- pág. 024*

*Ilustración 21 (Osteoblastos fetales a dos semanas de experimentación {con andamio}) ----- pág. 024*

*Ilustración 22 (Osteoblastos fetales a tres semanas de experimentación {sin andamio}) ----- pág. 024*

*Ilustración 23 (Osteoblastos fetales a tres semanas de experimentación {con andamio}) ----- pág. 024*

*Ilustración 24 (Diagrama de caja y brazos de los grupos de experimentación) ----- pág. 025*

### Resumen:

El presente proyecto plantea la creación de un filamento osteoinductor compuesto por la mezcla de un polímero denominado PLA (Ácido poliláctico) y un mineral (Fosfato tricálcico beta [ $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>], con el fin de que pueda ser usado en la ingeniería de tejidos como un acercamiento a la reparación ósea. El andamio propuesto es biocompatible y biodegradable debido a los materiales usados para su construcción y en conjunto estos materiales brindan al andamio una serie de características funcionales que permiten la proliferación de osteoblastos.

Los osteoblastos sembrados en el andamio deben de ser capaces de no solo proliferar sobre la superficie sino también deben de producir matriz extracelular ósea, lo que indicaría que el uso del andamio como injerto es viable. Para controlar la fragilidad y funcionalidad de los materiales por sí solos se propone combinarlos y aprovechar sus propiedades fisicoquímicas individuales para así lograr una estructura funcional que sirva como base para la neoformación ósea.

Con mira al futuro, este proyecto sienta las bases para un nuevo tipo de matriz celular artificial capaz de permitir el crecimiento, maduración y proliferación de células del sistema esquelético que en un punto pueda ser usada para reparar defectos óseos tanto de carácter agudo como crónico.

**Palabras clave: Matriz, Tejido, Filamento, Biocompatible, Biodegradable, Osteoinductor.**

## Abstract:

This project proposes the fabrication of an osteoinductive filament composed by PLA (Polilactic acid) and Beta tricalcic phosphate ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), with the goal that it may be used by tissue engineering as an alternative approach to bone repairment. The proposed scaffold is biocompatible and biodegradable due to the materials used to fabricate it, and together these compounds give the scaffold certain functional characteristics that allow osteoblast proliferation.

The seeded osteoblasts must be able to not only proliferate but also to produce bone extracellular matrix, and this signals that the use of the scaffold as a graft is viable. To control the fragility and functionality of the materials used by their own, this project proposes the combination between all of them to take advantage of the individual physicochemical properties of the compounds to achieve a functional structure that can work as a basis for bone formation.

It is within the potential of this project to lay the foundations for a new kind of artificial cellular matrix capable of allowing the growth, maturation, and proliferation of the skeletal system cells, and therefore the filament may someday be used to repair defects or damages (either chronic or acute) in different parts of the skeletal system.

**Key words: Tissue, Filament, Biocompatible, Biodegradable, Osteoinductive.**

## Antecedentes:

### Generalidades del Sistema esquelético:

El esqueleto humano lleva a cabo diversas funciones vitales. Protege y da soporte a tejidos más suaves y provee rigidez mecánica. Su superficie sirve de ancla para los músculos, tendones y ligamentos que les brindan postura y movimiento a las partes corporales. Es un sitio de almacenamiento de sales minerales, particularmente calcio, y partes del esqueleto sirven como fuente de células del sistema hematopoyético (1).

### Hueso:

El hueso es un tejido conectivo mineralizado que posee 4 tipos de células: osteoblastos, células del revestimiento óseo, osteocitos y osteoclastos, y ejerce importantes funciones en el cuerpo como la locomoción, soporte y protección de tejidos blandos, almacenaje de calcio y fosfatos y alberga la médula ósea. A pesar de su apariencia inerte, el hueso es un órgano altamente dinámico que es continuamente reabsorbido por los osteoclastos y neoformado por los osteoblastos (2).

El proceso de remodelado óseo es un proceso muy complejo mediante el cual el hueso viejo es reemplazado por tejido nuevo, en un ciclo que se compone de tres fases: la iniciación de la reabsorción ósea mediante los osteoclastos, la transición (o periodo reversible) de la reabsorción a la formación y la formación de hueso por los osteoblastos (3).

El equilibrio entre los dos procesos es, por lo tanto, necesario y depende de la acción de varios factores locales y sistémicos incluyendo hormonas, citocinas, quimiocinas y estimulaciones biomecánicas (4).

### Biología celular selecta:

#### Osteoblastos:

Los osteoblastos son células que forman tejido óseo. Pueden sintetizar y secretar matriz ósea y participan en la mineralización del hueso para regular el balance de calcio y fosfatos en el hueso en desarrollo. Muchos factores afectan la conversión de los osteoprogenitores, por ejemplo, varias hormonas y sustancias

bioactivas secretadas al momento de una fractura y en la presencia de estos factores, los osteoprogenitores pueden empezar a diferenciarse en osteoblastos que realizan funciones osteogénicas (5).

Son morfológicamente diversos, usualmente cúbicos o redondeados, planos o cilíndricos, con un diámetro de 20 a 50  $\mu\text{m}$ . Los osteoblastos en pleno desarrollo poseen un citoplasma alcalino el cuál puede estar relacionado a la presencia de un gran número de nucleosomas y retículo endoplásmico rugoso en el citoplasma de los osteoblastos (5).

#### Medicina regenerativa:

La medicina regenerativa es una de las áreas de la investigación biomédica que parece ser más prometedora: mientras que hoy en día la función de tejidos u órganos dañados se recupera con aparatos artificiales, la meta es que esos tejidos puedan ser reparados en un futuro mediante la inducción y/o guía de procesos regenerativos para restaurar las funciones normales (6).

La mayoría de los procedimientos actuales tratan de guiar la regeneración desde adentro del cuerpo en lugar de construir todo el tejido en un laboratorio, y en ese caso, por ejemplo, células exógenas no son necesarias: dependiendo del tejido a regenerar se pueden usar biomateriales, células o moléculas de señalización, o inclusive usar a las tres en diferentes combinaciones por lo que se dificulta determinar que tratamientos terapéuticos pueden ser llamados medicina regenerativa (6).

#### Andamios celulares:

Los andamios celulares tienen una importancia crítica para los ingenieros de tejidos dado que deben proveer un medioambiente química y mecánicamente adecuado en el cuál las células sembradas puedan proliferar y funcionar como se espera, y eventualmente formar un tejido completamente funcional (7).

Debe de existir en el andamio el suficiente espacio (poros) para el intercambio de gases y nutrientes, para la proliferación celular y para la deposición de nueva matriz extracelular. Las arquitecturas porosas confieren propiedades mecánicas similares a los tejidos (8).

Sin embargo, a excepción de algunos andamios de hidrogel, la mayoría de los andamios porosos poseen una naturaleza óptica opaca debido a una fuerte dispersión de la luz, y por lo tanto la estructura en 3D y una apariencia opaca causan problemas al adquirir información en tiempo real sobre el estado de degradación y formación del tejido mediante microscopía de luz convencional (8).

#### Biocompatibilidad:

La biocompatibilidad puede ser definida como la habilidad de un biomaterial, dispositivo o sistema para llevar a cabo su función planeada con respecto a una terapia médica sin evocar ningún efecto no deseado, local o sistémico, en el recipiente o beneficiario de la terapia (9).

Factores importantes que determinan la biocompatibilidad de un andamio son la química de los materiales usados, la estructura del andamio y su morfología (los que a su vez son afectados por el proceso de síntesis del biomaterial), así como también el método de manufactura del andamio y las condiciones de esterilidad (9).

Ejemplos de materiales sintéticos usados en una extensa gama de aplicaciones médicas y caracterizados por su buena compatibilidad son el PLA (Ácido poliláctico), PGA (ácido poliglicólico) y la polidioxanona (9).

#### Andamios celulares para reparación ósea:

El remodelado de hueso sucederá a lo largo de varios meses posterior a la fractura. Autoinjertos de diferentes huesos (la fíbula, la cresta iliaca, las costillas, etc.) son cosechados y usados para sustituir pequeños fragmentos de hueso, pero huecos muy grandes en los huesos son complejos de reparar. La ingeniería de tejidos ha logrado dar esperanza a pacientes debido a combinaciones novedosas entre células, andamios y biofactores que pueden ser usados para la regeneración de hueso (10).

Las siguientes preocupaciones deben de ser consideradas durante el diseño de andamios óseos: la biocompatibilidad en términos de la adhesión celular y proliferación así como una falta de toxicidad y reacciones inflamatorias, la biodegradación del andamio para una substitución segura del andamio con deposiciones osteoides, las propiedades mecánicas para aguantar las cargas

corporales durante el periodo de mejoría, la arquitectura adecuada en términos de porosidad y tamaño de los poros para permitir la penetración celular así como para la transferencia de nutrientes y productos y el desarrollo de angiogénesis, la esterilidad sin pérdida de bioactividad y la entrega controlada de moléculas o drogas bioactivas (10).

#### Osteoinducción:

La Osteoinducción es definida como el proceso por el cual la osteogénesis es inducida, y en efecto, este fenómeno está presente en la mayoría de los procesos de sanado óseo y materiales osteoinductores proveen un estímulo biológico para la inducción, reclutamiento, estimulación y diferenciación de células estromales indiferenciadas y pluripotentes en osteoblastos o preosteoblastos (14).

Los materiales osteoinductores incluyen autoinjertos, matriz de hueso desmineralizada y proteínas morfogénicas de hueso específicas que naturalmente forman hueso dentro del esqueleto. El sistema de regeneración ósea ideal deberá de ser construido con un material osteoinductor de reemplazo que evoque una respuesta celular apropiada con la ayuda de factores bioactivos que permitan el sanado y la regeneración ósea (11).

#### Biomateriales:

##### Biopolímeros:

Los biopolímeros son compuestos que poseen una existencia natural, están compuestos de unidades biológicas como nucleótidos, péptidos y azúcares, y son sintetizados por seres vivos en los 5 reinos. De los tres tipos de biopolímeros existentes en la naturaleza, los biopolímeros polisacáridos son los menos costosos y los más abundantes y se pueden subdividir en 4 categorías: biopolímeros de almidón, con azúcar como base, de celulosa y de lignina (12).

También pueden ser divididos en dos grandes categorías, biodegradables y no biodegradables. Si se toma el origen como punto de referencia se pueden clasificar en biopolímeros fósiles y biopolímeros no fósiles. Es usual encontrar más polímeros no fósiles no biodegradables que biopolímeros no fósiles degradables (13).



#### Ácido poliláctico:

El Ácido poliláctico (PLA por sus siglas en inglés), es una alternativa sustentable a los productos derivados de petroquímicos ya que puede ser producido a escala masiva mediante la fermentación microbiana de subproductos agrícolas, principalmente materia rica en carbohidratos (14).

La fuente principal de carbón para la síntesis de PLA puede ser azúcar en forma pura como glucosa, sucrosa, lactosa, etc., o materiales que contienen azúcar como melazas, trigo, desecho de caña de azúcar, almidones de papa, tapioca, centeno, entre otros (14).

Es un termoplástico biodegradable con un alto potencial debido a sus propiedades físicas específicas, que lo hacen útil en aplicaciones diversas incluyendo aplicaciones médicas y quirúrgicas (15).

#### Biominales:

Los biominales son sólidos inorgánicos producidos por una amplia variedad de organismos para endurecer tejidos. Los tejidos duros que contienen biominales son usados como soporte, protección y adquisición de recursos (16).

#### Fosfato Tricálcico beta:

El Fosfato Tricálcico (TCP, B-TCP o  $\beta$ -TCP) es un biomaterial biodegradable con la fórmula química  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , es estable a temperatura ambiente, se transforma en dos variantes según la temperatura a la que se calcine:  $\alpha$ -TCP a  $1225^\circ\text{C}$  y a  $\beta$ -TCP a  $800^\circ\text{C}$ . El  $\beta$ -TCP es el injerto degradable para hueso más comúnmente usado, la variante alfa es más reactiva y soluble y se suele usar en cementos de hueso. Ninguno de los dos puede ser sintetizado de manera acuosa (17).

La osteoinducción de los fosfatos de calcio está basada en la capacidad de estos compuestos de formar interacciones moleculares con los tejidos circundantes, lo que resulta en la formación de una capa de apatita sobre su superficie. Si las células se llegan a implantar en la superficie del biomaterial, los fosfatos estimulan la formación de osteoides, y esto es reconocido como la primera etapa en el mecanismo de remodelación ósea (18).

## Planteamiento del problema

La cura retrasada de fracturas, la pérdida de huesos debido a traumas, la artroplastia de articulaciones, la resección de tumores y la pseudoartrosis de la espina dorsal se mantienen como retos para los cirujanos.

A pesar de que es difícil imitar a la naturaleza, hallazgos tecnológicos y científicos recientes muestran potencial para generar andamios de cultivo celular para células óseas que pueden incentivar funciones biológicas locales y sistémicas.

Desde el punto de vista médico, el uso de polímeros biodegradables con suficiente resistencia mecánica y funcionalizados con biominerales ( $\text{Ca}^+$ ,  $\text{PO}_4^-$ ,  $\text{CO}_3^-$ , entre otros) podría finalmente llevar a encontrar un material que se pueda utilizar como andamiaje para inducir la neoformación ósea.

Dada la descripción de la problemática que se quiere abordar, se genera la siguiente pregunta de investigación que sirve de base para el resto del desarrollo de este trabajo: ¿Será posible diseñar un material mezclado que, una vez convertido en andamios mediante impresión 3D, demuestre características biológicas favorables que le permitan servir como plataforma de regeneración ósea?

### Objetivo general:

- Desarrollar un andamio compuesto de PLA y  $\beta$ -TCP que permita la proliferación de osteoblastos.

### Objetivos específicos:

- Generar filamentos compuestos de PLA y  $\beta$ -TCP.
- Obtener andamios mediante impresión 3D de los filamentos generados.
- Someter los andamios a interacción con osteoblastos.
- Medir la viabilidad celular de osteoblastos cultivados sobre el andamio.

### Hipótesis de trabajo:

Hipótesis nula ( $H_0$ ): Un andamio impreso en 3D compuesto de la combinación entre un biopolímero (PLA) y un biomaterial ( $\beta$ -TCP) no generará un ambiente celular capaz de permitir la proliferación de osteoblastos.

Hipótesis alternativa ( $H_a$ ): Un andamio impreso en 3D compuesto de la combinación entre un biopolímero (PLA) y un biomaterial ( $\beta$ -TCP) generará un ambiente celular capaz de permitir la proliferación de osteoblastos.

### Tipo de estudio y diseño general:

El tipo de estudio es analítico, longitudinal, observacional y prospectivo; al ser el desarrollo de un andamio celular.

### Variables dependientes:

- Porcentaje de viabilidad celular
- Producción de nódulos de calcio

### Variables independientes:

- Proporción PLA/ $\beta$ -TCP
- Diámetro y grosor del andamio

### Recolección de la información:

En el desarrollo del trabajo se llevaron a cabo: la generación de andamios de PLA/ $\beta$ -TCP, el cultivo de osteoblastos sobre los andamios, pruebas de viabilidad celular y detección de nódulos de calcio mediante inspección visual por microscopía electrónica de barrido.

### Consideraciones éticas:

Dado que los experimentos se hicieron sobre células, no se consideraron aspectos éticos más allá de atender las recomendaciones de la declaración de Helsinki y la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos. La aprobación de un comité de bioética no es necesaria.

## Análisis estadísticos:

### Estadística descriptiva:

Se generó un cuadro de resumen de las medidas obtenidas, se presentaron las medias generales de las mediciones por cada grupo experimental, la desviación estándar, la varianza y el error estándar, junto con gráficos de resumen.

### Estadística inferencial:

Se realizaron pruebas ANOVA sobre los datos obtenidos así como pruebas post hoc de Tukey para determinar las diferencias entre los grupos de experimentación. Estas pruebas están apoyadas sobre un análisis Levene para verificar la susceptibilidad de comparación entre las varianzas y pruebas de Shapiro-Wilk para verificar normalidad de los datos. Para analizar los datos se usó el software ofimático Excel 2020.

## Metodología:

### Síntesis de filamento compuesto:

1. Se obtuvieron 700 mg de  $\beta$ -TCP y 4,666 mg de PLA para una composición de material 15/75 w/w y 700 mg de  $\beta$ -TCP y 3,500 mg de PLA para una composición de material 20/80 w/w.
2. En un vaso de precipitado se colocaron 25 mL de cloroformo y 25 mL de acetona (anhídridos) y se mezcló uniformemente (solución A).
3. Se colocó el PLA y el  $\beta$ -TCP en frascos Erlenmeyer y se adicionaron 25 mL de la solución A. Se agregaron agitadores magnéticos y se dejaron los frascos sobre una parrilla eléctrica a 37°C y 700 RPM durante 4 horas o hasta que se hubiese disuelto completamente el PLA (solución B).
4. Se colocó la solución B en cajas de Petri de vidrio para permitir la evaporación de los solventes, para obtener una lámina de materia prima.
5. Se calentó dicha lámina a 190°C y se mezcló uniformemente todo el material para obtener una masa de trabajo.
6. Se colocó una pequeña porción de la masa de trabajo en el canal perforado de un bloque de acero tornado (diagrama en anexos), calentado a 200°C. Se prensó con pinzas de presión el bloque hasta lograr sellarlo. Se enfrió el bloque de acero y se abrió para acceder al filamento prensado.

7. Se retiró el exceso de material de los bordes del filamento y se volvió a prensar una vez más.
8. Se retiró el exceso de material y se almacenaron los filamentos hasta su utilización.

Impresión de andamio:

1. El día previo a la impresión, se fundieron los filamentos para unirlos por pares.
2. Cada pedazo de 10 cm de filamento se introdujo en el cabezal de una impresora 3D (Marca de la impresora® Modelo), y mediante extrusión se imprimieron discos de 1 mm de diámetro por 1 mm de espesor.

Caracterización superficial:

1. Se tomó un ejemplar de cada andamio pre y post exposición al linaje celular, y se sometieron ambas muestras a microscopía electrónica de barrido.

Espectroscopía infrarroja:

1. Se tomó un ejemplar de cada andamio preexposición a los osteoblastos, un ejemplar de un andamio sin biomineral y una muestra del biomineral puro, y mediante un equipo de FT-IR (Jasco® FT-IR 4100) se obtuvo el espectro infrarrojo del material.

Interacción osteoblasto-andamio:

1. Se produjeron suficientes andamios para poder realizar el experimento por quintuplicado y por 21 días.

En 3 cajas de 96 pozos se colocaron andamios de cada compuesto incluyendo andamios de PLA sin biomineral, se asignaron dos hileras de pozos para un control vida (control +), un control muerte (control -) y un blanco. A continuación se muestra el acomodo de grupos que se siguió en

el experimento:

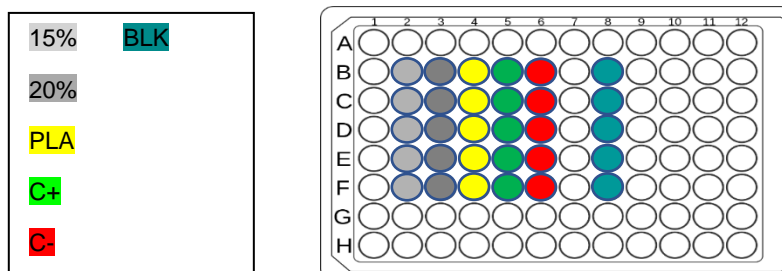


Ilustración 1 Diagrama de la colocación de muestras en caja de 96 pozos

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
2. Mediante la American Type Culture Collection se obtuvo una línea celular ATCC® hFOB 1.19, la cual es de osteoblastos humanos fetales. Se descongeló un vial de células, se sembró en cajas T75 de ThermoFisher®, se incubaron las cajas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en medio DMEM suplementado con penicilina y streptomina y se dejó alcanzar 80% de confluencia, reemplazando el medio usado con medio nuevo cada dos días.
  3. Alcanzada la confluencia las células se tripsinizaron y se contaron en cámara de Neubauer.
  4. Se colocaron 1000 células por pozo por cada andamio, grupo de experimentación y caja, se adicionó medio DMEM suplementado en cada pozo y se incubaron durante 21 días a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, reemplazando el medio cada dos días.

#### Viabilidad Celular:

1. Se sacó una caja de experimentación y se retiró el medio de cada pozo.
2. Se adicionaron 50 µL de medio DMEM libre de suero y rojo fenol más 50 µL de reactivo MTT.
3. Se incubó la caja durante 3 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> protegida de la luz.
4. Se retiró el medio y el reactivo MTT y se agregaron 150 µL de solvente para MTT. Se incubó la caja durante 30 minutos y transcurrido ese tiempo se transfirió el líquido de cada pozo a una caja nueva para poder realizar mediciones en espectrofotómetro.
5. Usando los filtros de 450 nm y 620 nm se realizaron lecturas de la caja, los valores obtenidos fueron concentrados en una tabla y sometidos a análisis estadístico.

#### Resultados:

##### Síntesis de filamento compuesto:

Se evaluaron varias combinaciones de solventes y cantidad de materia prima para lograr una disolución y suspensión adecuadas de los materiales. Una proporción 1:1 de cloroformo y acetona resultó ser la combinación más conveniente al permitir al material disolverse sin necesidad de agregar calor, y la disolución de

PLA y solventes probó poseer una consistencia tal que la dispersión de partículas de  $\beta$ -TCP en la matriz polimérica permitió obtener una composición homogénea a través de todo el material.

A continuación se muestran 4 imágenes que detallan el proceso de manufactura del filamento. Las figuras A, B y C muestran la disolución y/o dispersión de los compuestos en el solvente y su concentración, mientras que la imagen D muestra los filamentos terminados. La imagen E muestra el molde usado para la formación de los filamentos:

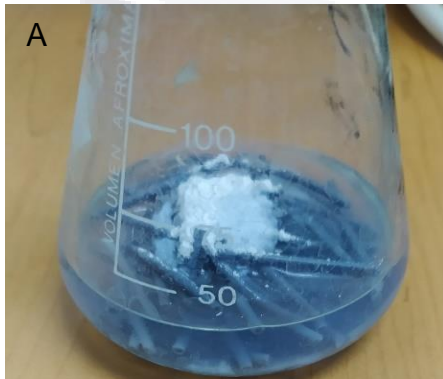


Ilustración 2 Materiales crudos.

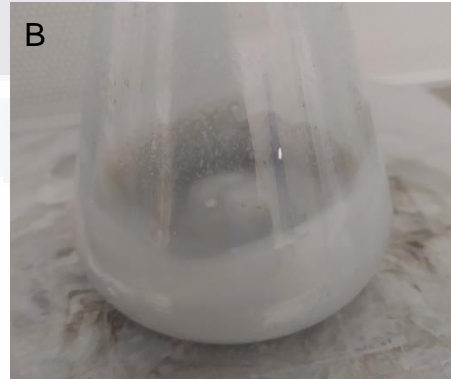


Ilustración 3 Etapa de mezclado de los materiales.

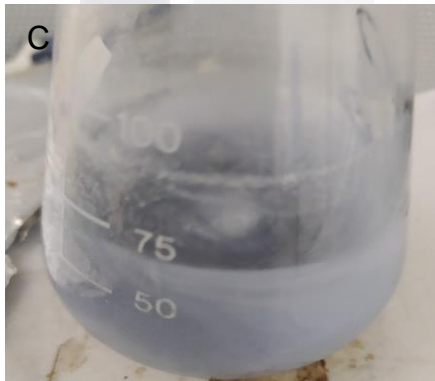


Ilustración 4 Evaporación del solvente y concentración de mezcla.

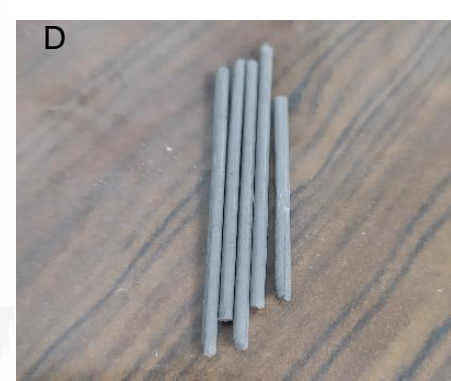


Ilustración 5 Filamentos formados.



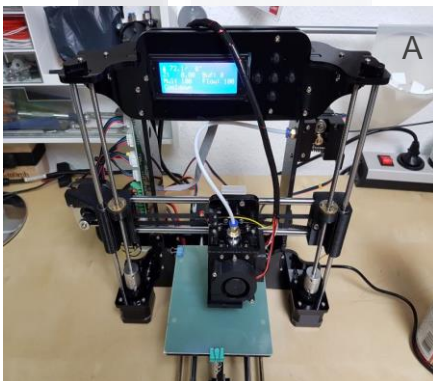
Ilustración 6 Molde usado para la formación de los filamentos.

Los filamentos obtenidos mostraron una disminución en la flexibilidad, se pudo observar fácilmente comparando la deformación del material al doblar una muestra compuesta y una de PLA puro.

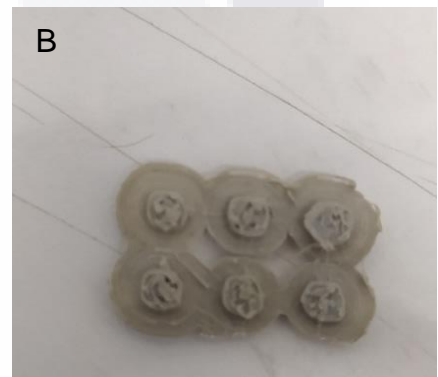
**Impresión de andamio:**

La impresión de los andamios presentó dificultades propias de trabajar con un material nuevo, sin embargo la impresora fue capaz de producir estructuras 3D usando el filamento compuesto como base. Se imprimieron dos tipos de discos, unos con 15% de  $\beta$ -TCP en su composición y otros con 20%. Se diferencian ambos por el color del filamento base de PLA.

Las imágenes que se exponen a continuación muestran: A) la impresora usada, B) los discos (andamios) impresos, C) Detalle estereoscópico de la vista superior del andamio y D) Detalle estereoscópico de la vista inferior del andamio:



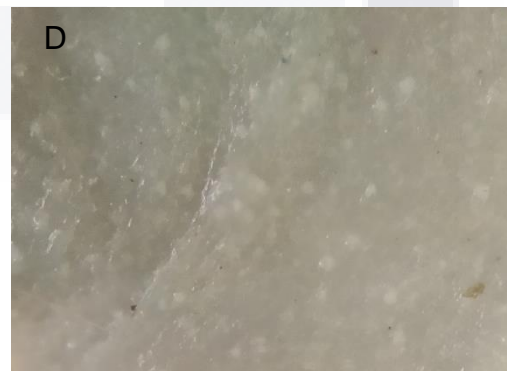
*Ilustración 7 Impresora 3D usada {TronXY® XY-100}*



*Ilustración 8 Andamios impresos.*



*Ilustración 9 Fotografía estereoscópica de un andamio (vista superior).*



*Ilustración 10 Fotografía estereoscópica de un andamio (vista inferior).*



### Caracterización superficial:

La microscopía electrónica de barrido facilitó la observación de la estructura microscópica de la superficie de los andamios. A pesar de que las imágenes obtenidas no permiten asegurar al 100% la presencia de nódulos de calcio, los artículos revisados sugieren que en efecto los gránulos del biomineral deben de ser visibles en la superficie del andamio.

Se muestran imágenes de la superficie inferior de los andamios impresos: la figura A) muestra un andamio de PLA puro a 500X, la figura B) muestra un andamio con 15% de TCP a 500X, la imagen C) muestra un andamio con 20% de TCP a 500X, la figura D) corresponde a un andamio de PLA puro a 1500X, la figura E) ilustra a un andamio con 15% de TCP a 1500X y finalmente la imagen F) señala un andamio con 20% de TCP a 1500X. En círculos rojos se muestran los posibles nódulos de calcio.

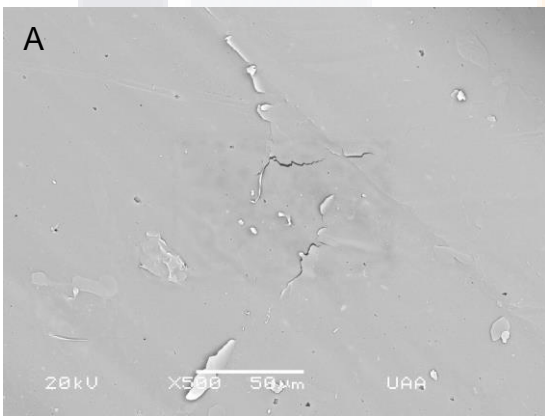


Ilustración 11 Microfotografía (500X) de un andamio de PLA puro.

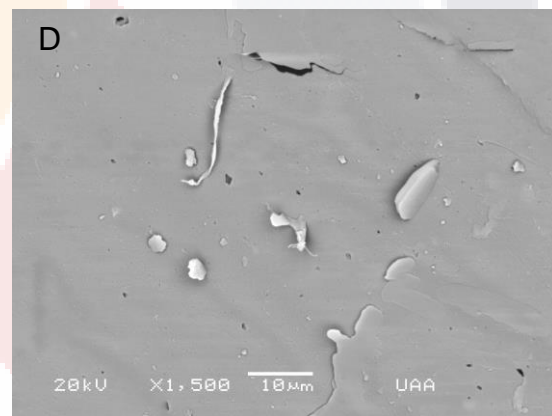


Ilustración 12 Microfotografía (1500X) de un andamio de PLA puro.

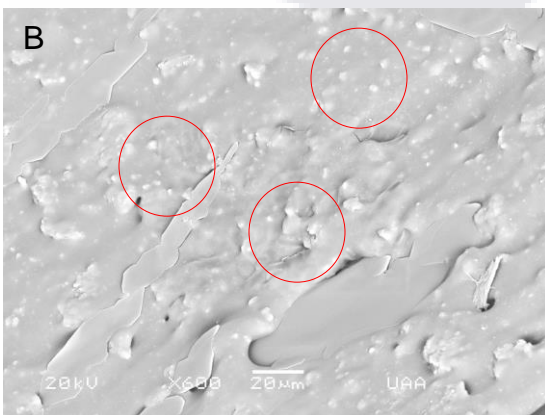


Ilustración 13 Microfotografía (500X) de un andamio de 15% b-TCP y 85% PLA.



Ilustración 14 Microfotografía (1500X) de un andamio de 15% b-TCP y 85% PLA.



Ilustración 15 Microfotografía (500X) de un andamio de 20% b-TCP y 80% PLA.

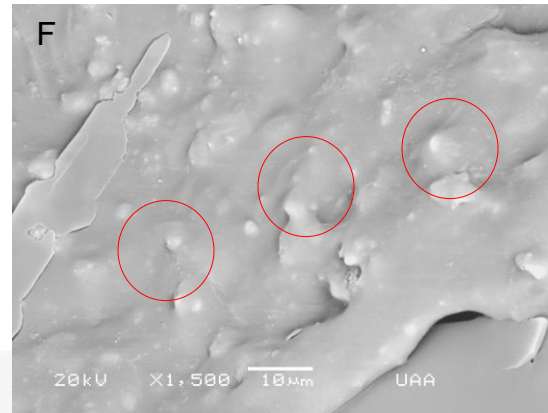


Ilustración 16 Microfotografía (1500X) de un andamio de 20% b-TCP y 80% PLA.

### Espectroscopía infrarroja

Se sometieron los andamios a un análisis de espectroscopía infrarroja usando transformadas de Fourier para detectar la presencia de grupos funcionales característicos tanto del PLA como del TCP. A continuación se muestran los perfiles infrarrojos de las materias primas y de los materiales compuestos. En círculos verde se encuentran señalados los picos característicos del B-TCP y en azul los picos característicos del PLA.

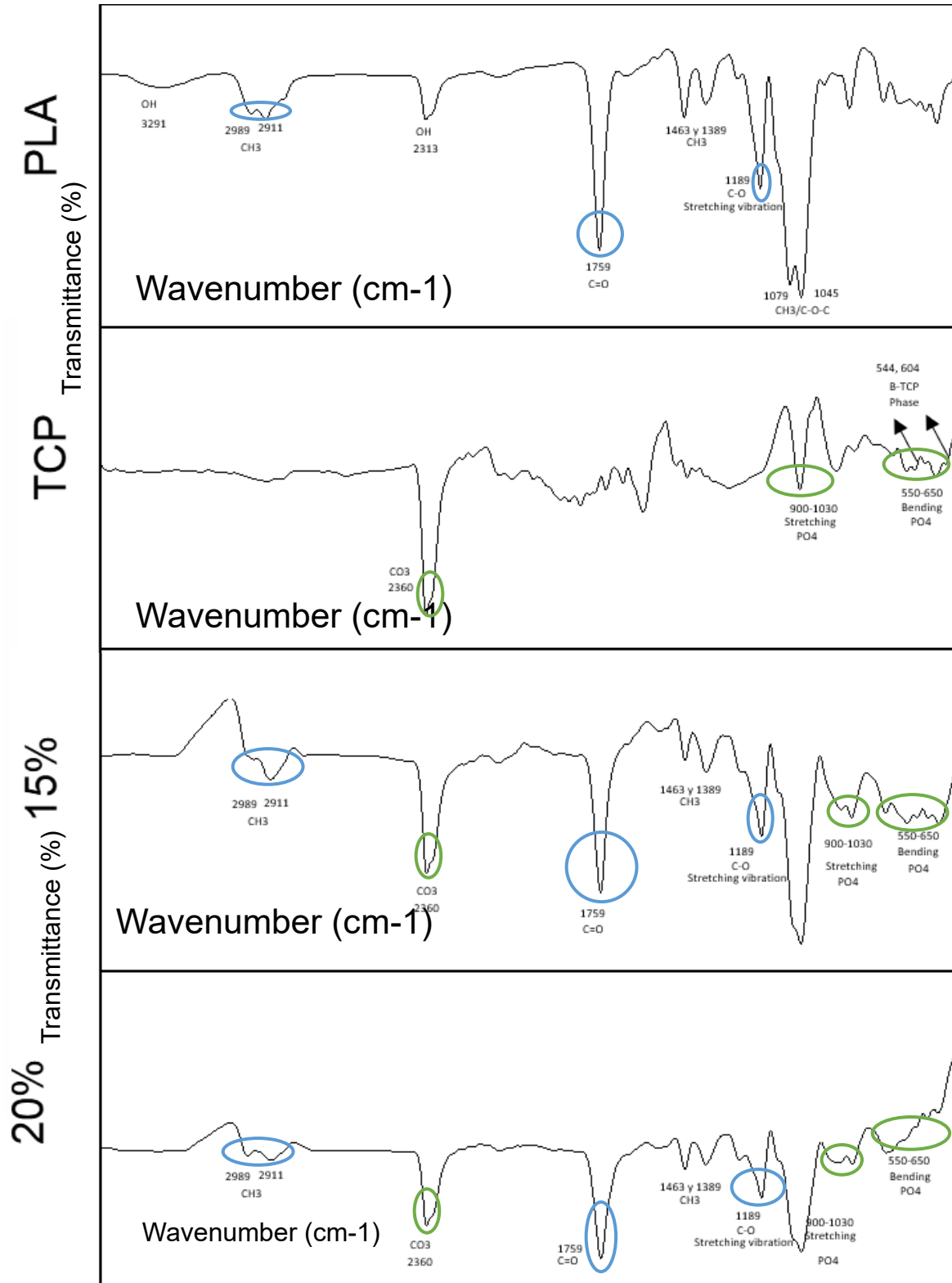


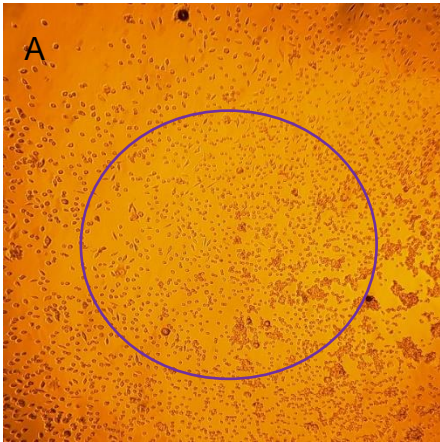
Ilustración 17 Espectro de FTIR obtenido para los materiales puros y los andamios impresos.

En resumen, se puede destacar que ambos filamentos presentan señales que corresponden a cada materia prima, por lo que se infiere que si se realizó una mezcla adecuada entre el polímero y el biomineral. Conforme avanzó el experimento, las señales se fueron modificando, posiblemente ocasionadas por la liberación del biomineral de la matriz así como al metabolismo de los osteoblastos.

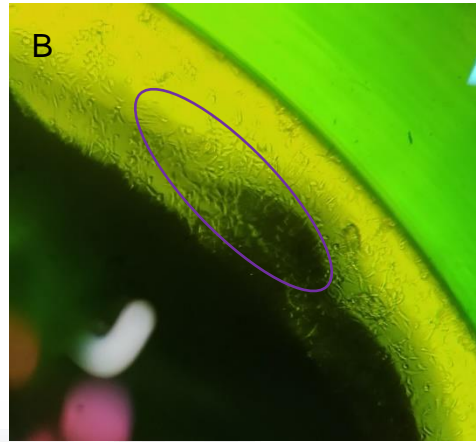
#### Interacción osteoblasto-andamio:

Los andamos no inhibieron el crecimiento de los osteoblastos, alrededor de cada uno se observaron osteoblastos creciendo y proliferando, el medio de cultivo mantuvo un pH estable (evidenciado por la falta de viraje en rojo fenol) durante todo el desarrollo del experimento. Durante la primera semana no se observó degradación del material, pero para la segunda y tercera semana el material se había degradado parcialmente, evidenciado por la falta de integridad estructural en la gran mayoría de las muestras. Dado que el andamio es ópticamente opaco, no fue posible determinar (en esta fase de experimentación) si existían células viviendo sobre el andamio, pero la falta de células en el fondo de la placa sugiere que había osteoblastos interactuando directamente con el material.

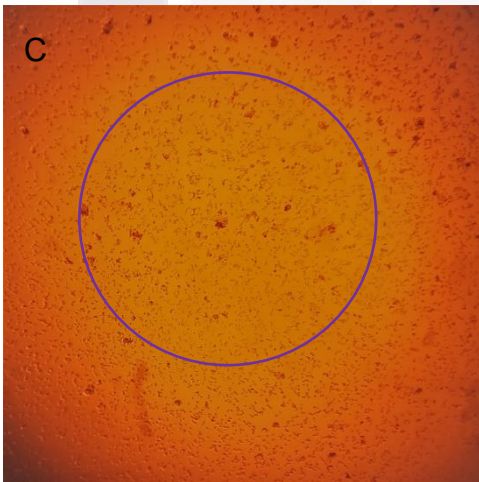
Las siguientes imágenes fueron capturadas a lo largo del experimento, se reportan imágenes para los días 7, 14 y 21. En las imágenes A) y B) observamos una población celular estable y en fase de crecimiento, la presencia del andamio en la imagen B) no ha alterado su viabilidad. En las imágenes C) y D) se ilustra a la misma población después de 14 días de experimento, donde se empieza a observar una estabilización de la población luego de que esta disminuyera en la semana debido a falta de espacio en la superficie de la caja, pero la presencia del andamio en la figura D) estimula el crecimiento de osteoblastos. Finalmente las imágenes E) y F) muestran a la población celular luego de 21 días de crecimiento, se observa una población celular sana, con la presencia del andamio en la figura F) sin alterar negativamente el ciclo celular de los osteoblastos. En círculos morados se señalan células en cultivo.



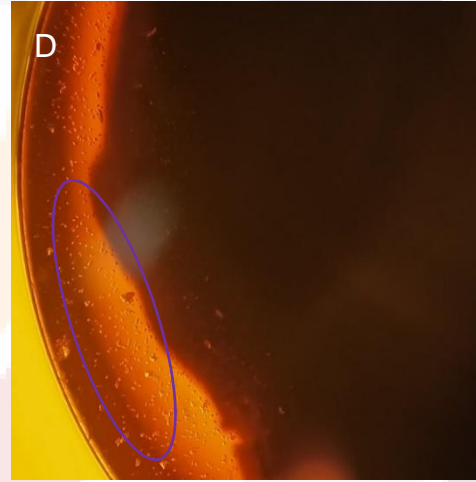
*Ilustración 18 Osteoblastos fetales a una semana de experimentación (sin andamio).*



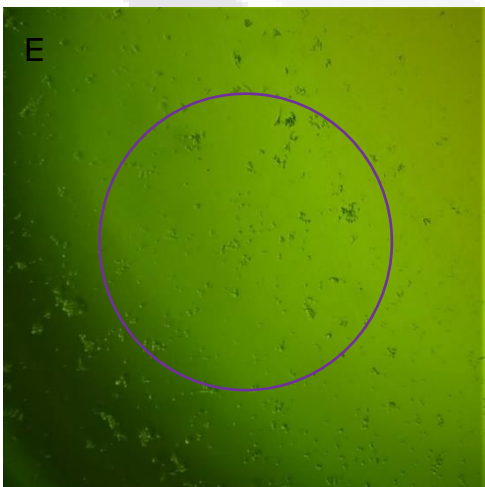
*Ilustración 19 Osteoblastos fetales a una semana de experimentación (con andamio).*



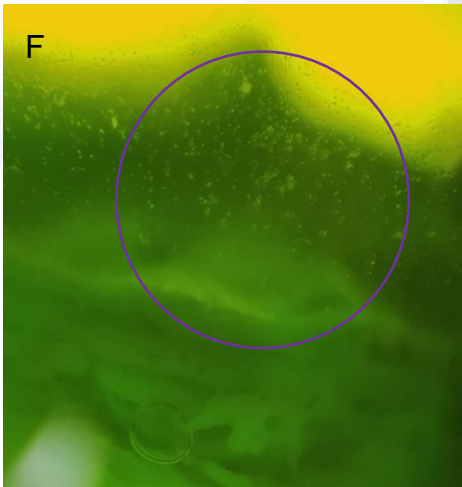
*Ilustración 20 Osteoblastos fetales a dos semanas de experimentación (sin andamio).*



*Ilustración 21 Osteoblastos fetales a dos semanas de experimentación (con andamio).*



*Ilustración 22 Osteoblastos fetales a tres semanas de experimentación (sin andamio).*



*Ilustración 23 Osteoblastos fetales a tres semanas de experimentación (con andamio).*

Viabilidad Celular:

Los datos de los grupos de experimentación expresados en porcentaje de viabilidad celular se vaciaron dichos datos en una tabla la cual se muestra a continuación:

**Tabla 1. Viabilidad celular de los grupos de experimentación a 7, 14 y 21 días**

Tiempo	15% $\beta$ -TCP	20% $\beta$ -TCP	PLA
Semana 1 Observación 1	0.998	0.908	0.731
Semana 1 Observación 2	0.962	1.101	0.918
Semana 1 Observación 3	1.013	0.888	0.823
Semana 1 Observación 4	0.947	0.980	0.784
Semana 1 Observación 5	1.042	1.076	0.715
Semana 2 Observación 1	0.867	0.808	0.724
Semana 2 Observación 2	0.991	0.703	0.651
Semana 2 Observación 3	0.862	0.913	0.593
Semana 2 Observación 4	0.852	0.939	0.656
Semana 2 Observación 5	0.879	0.839	0.538
Semana 3 Observación 1	1.183	0.933	0.693
Semana 3 Observación 2	0.976	0.936	0.762
Semana 3 Observación 3	0.899	0.877	0.556
Semana 3 Observación 4	1.028	0.871	0.481
Semana 3 Observación 5	0.786	0.869	0.621
<b>Media</b>	0.952	0.910	0.683
<b>Desviación estándar</b>	0.098	0.098	0.116
<b>Porcentaje de Viabilidad</b>	1.287	1.227	0.904

$\beta$ -TCP: fosfato tricálcico beta, PLA: Ácido poliláctico.

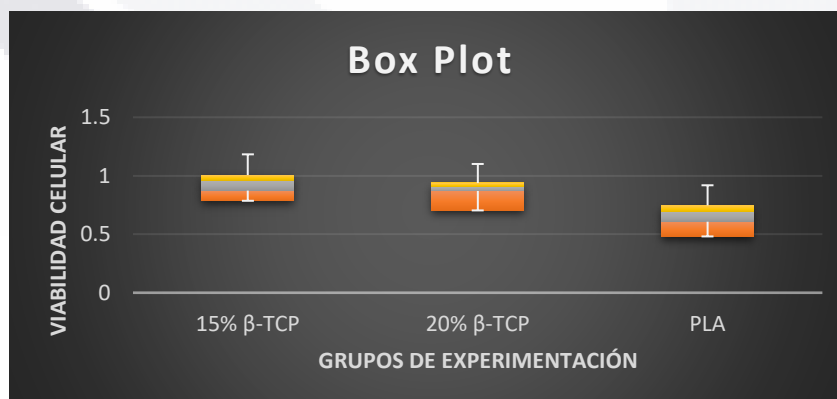


Ilustración 24 Diagrama de caja y brazos de los grupos de experimentación.

**Tabla 2. Análisis de varianza de los grupos de experimentación.**

<b>GRUPO</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>p</b>
<b>15% β-TCP</b>	14.29196	0.098	0.001
<b>20% β-TCP</b>	13.6561	0.098	
<b>PLA</b>	10.25392	0.116	

Prueba estadística ANOVA de 1 vía; β-TCP: Fosfato tricálcico beta, PLA: Ácido poliláctico. Análisis post hoc: 15% vs 20% no significativo, 15% vs PLA significativo {p<0.003}, 20% vs PLA significativo {p<0.001%}.

Según los análisis realizados, los datos siguen una distribución normal, con varianzas similares, el análisis de varianzas reveló un valor P inferior al punto de corte ( $p < 0.001$ ) por lo que se rechaza la hipótesis de que no hay diferencias significativas entre las medias de viabilidad de cada grupo de experimentación. Esto es soportado por la prueba post-hoc de Tukey, que se usa para determinar el origen de las variaciones, y este análisis reveló que las diferencias significativas están entre los grupos de 15% β-TCP ( $p < 0.003$ ) y 20% β-TCP ( $p < 0.001$ ) con respecto al grupo de control, donde solo existía el polímero por sí mismo junto a los osteoblastos, por lo que podemos determinar que existe un mejor crecimiento cuando un biomineral está expuesto a una población de osteoblastos mediante una matriz biocompatible.

**Discusión:**

Para obtener una muestra homogénea de los materiales, la mayoría de los autores usan un método de mezclado que involucra calentar los materiales y así fusionarlos entre sí.

Babilotte et al., reportaron que una mezcla homogénea de biomineral y bioplástico puede ser obtenida mezclando los materiales en una cámara de fundición, usando el punto de fusión del PLA para hacer que el β-TCP entre a la matriz polimérica, para después de la mezcla extruir los filamentos (19).

La mayoría de los sustratos bioactivos que se imprimen son fabricados usando modelado por deposición de fusión (MDF), un método de impresión que toma una hebra continua de material que es fundido y extruido por una boquilla para

controlar el flujo del material y poder depositarlo sobre una superficie caliente, capa tras capa, hasta que los constructos son fabricados (20), sin embargo el presente trabajo demostró que una ruta química también puede ser usada para generar filamentos compuestos, y después se demostró que el proceso de impresión es similar al hecho usando PLA puro mediante la técnica de MDF.

La microscopía electrónica de barrido habilitó una vista a la superficie microscópica de los andamios. Se menciona que a bajas concentraciones, el TCP mezclado debe de ser visible en forma de gránulos, pero existe un riesgo de tapar los poros generados si se utiliza un plástico muy grueso (21). A pesar de que las imágenes obtenidas no pueden garantizar la presencia en su totalidad de TCP, se sugiere que las protuberancias que se observan en las microfotografías probablemente se deban a nódulos de biomineral.

En un análisis de FTIR se obtiene un espectro infrarrojo de emisión o de absorción de los materiales analizados, y la información se presenta usualmente en transmitancia vs número de onda. En el PLA, los picos en  $1750$  y  $1180\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a los enlaces C=O y C-O-C respectivamente son característicos y deben de ser claramente visibles (22). Asimismo nuestros resultados son concordantes con estas aseveraciones, observando los análisis de FTIR llevados a cabo en los materiales puros y en los andamios. No solo esos picos están presentes en la muestra de PLA puro, sino que se mantienen en ambos tipos de andamios, y fueron consistentes todas las muestras analizadas.

El espectro FTIR del B-TCP muestra que los iones fosfato tienen cuatro modos vibracionales: V1, V2, V3 y V4. Con base en esto, las bandas observadas a  $960\text{ cm}^{-1}$  y a  $470\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los modos V1 y V2 respectivamente, las bandas en  $1092\text{ cm}^{-1}$  y  $1030\text{ cm}^{-1}$  son del modo vibracional 3, y las bandas en  $605$  y  $555\text{ cm}^{-1}$  corresponden al modo vibracional 4 (23). El equipo de FTIT registró todos los picos reportados en la literatura como presentes en la muestra de B-TCP y de los andamios a diferentes concentraciones del biomineral, revelando que el proceso químico si genera una mezcla estable de la matriz polimérica con la sustancia activa.



Montjovent et al., revelaron que a medida que el contenido de hidroxiapatita en el andamio incrementa, se obtiene mejor anclaje celular ya que mas nanocristales del material pueden estar expuestos en la superficie del andamio compuesto (24), y esto es justamente lo que se observa a lo largo del experimento, dado que las células fueron capaces de proliferar durante todo el cultivo.

Por otro lado, el uso de un andamio de colágeno y TCP presenta una interacción favorable con la viabilidad celular, estimulando la proliferación de osteoblastos murinos y la síntesis de biomarcadores (fosfatasa alcalina y osteocalcina). Se demostró la buena biocompatibilidad del andamio mediante una prueba MTT con un alto porcentaje de células viables observado (25). Durante el experimento, los resultados fueron los mismos a los descritos previamente. Los osteoblastos cultivados que estaban en contacto con el B-TCP crecieron, proliferaron y se mantuvieron viables por un largo tiempo, mientras que las células que crecieron sin la presencia de un andamio nunca alcanzaron el nivel de proliferación que los grupos experimentales.

Después de dos semanas de cultivo, un experimento usando PLA, B-TCP y un vidrio bioactivo como componentes reportó que el número de células era significativamente mayor en el grupo con TCP que en los otros andamios que no lo poseían. No hubieron diferencias significativas entre dos concentraciones de B-TCP y vidrio bioactivo (10% TCP y 20% TCP respectivamente), pero si existían diferencias entre la presencia o ausencia del biomineral (26).

Otro experimento realizado por Haimi, et al., también apoya los resultados descritos, cuando se usan dos concentraciones de B-TCP no se hayan diferencias entre ellas, pero si existe una marcada diferencia entre tener y no tener presente el biomineral (27). Estas dos investigaciones apoyan los resultados que se muestran en el apartado de viabilidad celular, donde se observa la misma tendencia que la ya reportada.

## Conclusiones:

El presente proyecto demostró que es posible usar un proceso de unión química para obtener filamentos compuestos de PLA y B-TCP, se demostró que los filamentos pueden ser usados para impresión de modelos (andamios) 3D, que estos andamios no son tóxicos y son biocompatibles, que estimulan la proliferación, crecimiento y mantenimiento de poblaciones de osteoblastos, y que estas poblaciones expuestas al material compuesto demuestran una viabilidad celular mejorada cuando se compara con poblaciones sin la presencia del andamio.

Con la evidencia anteriormente presentada se puede concluir lo siguiente: se rechaza la hipótesis nula, por lo que si es posible generar un andamio impreso en 3D compuesto de la combinación entre un biopolímero (PLA) y un biomineral ( $\beta$ -TCP), y este andamio genera un ambiente celular capaz de permitir la proliferación de osteoblastos.

## Bibliografía:

1. Gentry Steele D, Bramblett CA. Bone Biology. In: Gentry Steele D, Bramblett CA, editors. *The Anatomy and Biology of the Human Skeleton*. College Station, TX: Texas A & M University Press; 1994. p. 10–20.
2. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015:421–46. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/421746>
3. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2008;19(5):444–51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.07.016>
4. Crockett JC, Mellis DJ, Scott DI, Helfrich MH. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int* [Internet]. 2011;22(1):1–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-010-1272-8>
5. Qiu ZY, Cui Y, Wang XM. Natural Bone Tissue and Its Biomimetic. In: Wang X-M, Qiu Z-Y, Cui H, editors. *Mineralized Collagen Bone Graft Substitutes*. Cambridge, England: Woodhead Publishing; 2019. p. 1–22.

6. Doser M, Planck H. Textiles for implants and regenerative medicine. In: Bartels VT, editor. Handbook of Medical Textiles. Cambridge, England: Woodhead Publishing; 2011. p. 132–52.
7. Tomlins P. Material types for tissue scaffolds. In: Tomlins P, editor. Characterisation and Design of Tissue Scaffolds. Cambridge, England: Woodhead Publishing; 2015. p. 1–21.
8. Yang Y, Wimpenny I. Image analysis and quantification of tissue scaffolds. In: Tomlins P, editor. Characterisation and Design of Tissue Scaffolds. Cambridge, England: Woodhead publishing; 2015. p. 201-233.
9. Nardo T, Irene C, Ruini F, Silvia C, Calzone S, Chiono V. Synthetic Biomaterial for Regenerative Medicine Applications. In: Orlando G, Remuzzi G, Williams DF, editors. Kidney transplantation, bioengineering, and regeneration: Kidney transplantation in the regenerative medicine era. San Diego, CA: Academic Press; 2017. p. 901–21.
10. Ghassemi T, Shahroodi A, Ebrahimzadeh MH, Mousavian A, Movaffagh J, Moradi A. Current concepts in scaffolding for bone tissue engineering. Arch Bone Jt Surg. 2018;6(2):90–9.
11. Di Silvo L, Jayakumar P. Cellular Response to Osteoinductive Materials in Orthopaedic Surgery. In: Di Silvio L, editor. Cellular Response to Biomaterials. Cambridge, England: Woodhead Publishing; 2009. p. 313-43.
12. Kumari P, Lal S, Singhal A. Advanced applications of green materials in catalysis applications. In: Ahmed, S, editor. Applications of Advanced Green Materials. Ann Arbor, MI: Elsevier; 2021. p. 545–71.
13. Niaounakis M. Introduction. In: Niaounakis M, editor. Biopolymers: Processing and Products. Ann Arbor, MI: Elsevier Science & Technology Books; 2014. p. 1–77.
14. Madhavan Nampoothiri K, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. Bioresour Technol [Internet]. 2010;101(22):8493–501. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.092>
15. García-Ibarra V, Sendón A, Rodríguez-Bernardo de Quirós A. Antimicrobial Food Packaging Based on Biodegradable Materials. In: Barros-Velázquez J, editor. Antimicrobial Food Packaging. London, England: Academic Press Inc; 2016. p. 364-87
16. Kay AD, Vrede T. Evolutionary and Biochemical Aspects. In: Jorgensen SE, Fath BD, editors. Encyclopedia of Ecology. 2nd ed. Elsevier Science & Technology; 2014. p. 1472–81.

17. Huang J. Design and Development of Ceramics and Glasses. In: Vishwakarma A, Karp JM, editors. *Biology and engineering of stem cell niches*. San Diego, CA: Academic Press; 2017. p. 315–29.
18. Van Vugt VA, Geurts J, Arts JJ, Lindfors NC. Biomaterials in Treatment of Orthopedic Infections. In: Arts JJ, Geurts J, editors. *Management of Periprosthetic Joint Infections (PJIs)*. Cambridge, England: Woodhead Publishing; 2016. p. 41–68.
19. Babilotte J, Guduric V, Le Nihouannen D, Naveau A, Fricain J-C, Catros S. 3D printed polymer-mineral composite biomaterials for bone tissue engineering: Fabrication and characterization: 3D printed composite biomaterials for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* [Internet]. 2019;107(8):2579–95. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.34348>
20. Cichoń E, Harażna K, Skibiński S, Witko T, Zima A, Ślósarczyk A, et al. Novel bioresorbable tricalcium phosphate/polyhydroxyoctanoate (TCP/PHO) composites as scaffolds for bone tissue engineering applications. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2019;98:235–45. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.06.028>
21. Mofokeng JP, Luyt AS, Tábi T, Kovács J. Comparison of injection moulded, natural fibre-reinforced composites with PP and PLA as matrices. *J Thermoplast Compos Mater* [Internet]. 2012;25(8):927–48. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1177/0892705711423291>
22. Choi D, Kumta PN. Mechano-chemical synthesis and characterization of nanostructured  $\beta$ -TCP powder. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* [Internet]. 2007;27(3):377–81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.035>
23. Fang R, Zhang E, Xu L, Wei S. Electrospun PCL/PLA/HA based nanofibers as scaffold for osteoblast-like cells. *J Nanosci Nanotechnol* [Internet]. 2010;10(11):7747–51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2010.2831>
24. Montjovent M-O, Mathieu L, Hinz B, Applegate LL, Bourban P-E, Zambelli P-Y, et al. Biocompatibility of bioresorbable poly(L-lactic acid) composite scaffolds obtained by supercritical gas foaming with human fetal bone cells. *Tissue Eng* [Internet]. 2005;11(11–12):1640–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.2005.11.1640>
25. Oprita E, Moldovan L, Craciunescu O, Zarnescu O. In vitro behaviour of osteoblast cells seeded into a COL/ $\beta$ -TCP composite scaffold. *Open Life Sci*

[Internet]. 2008;3(1):31–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2478/s11535-007-0047-5>

26. Haimi S, Suuriniemi N, Haaparanta A-M, Ellä V, Lindroos B, Huhtala H, et al. Growth and osteogenic differentiation of adipose stem cells on PLA/bioactive glass and PLA/beta-TCP scaffolds. Tissue Eng Part A [Internet]. 2009;15(7):1473–80. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0241>
27. Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. Biomaterials [Internet]. 2005;26(17):3587–96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.046>

