

# **UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

## **SISTEMAS DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

CARACTERIZACIÓN Y BIOCOMPATIBILIDAD DE UN ANDAMIO DE ÁCIDO POLI LÁCTICO FABRICADO  
POR MEDIO DE IMPRESIÓN 3D

Trabajo final de investigación aplicada sometido a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Odontología para optar al grado y título de Maestría Profesional en Odontología con énfasis en Prostodoncia.

**DIANA MARCELA VILLALOBOS VEGA**

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2018

## DEDICATORIA

---

A Dios y a la Virgen María, porque me dieron las fuerzas durante este proceso y sé que nunca me dejaron sola.

Con todo mi amor a mi esposo Jorge, por su paciencia, sacrificio, esfuerzo y amor. Por levantarme y animarme cuando pensé que ya no aguantaba más y sobre todo por creer en mis sueños. A mi hija, fruto de este amor, desde ya te dedico todos mis anhelos. Los amo.

A mis papás, que siempre han confiado en mis sueños y como una planta los han regado y cuidado como si fueran suyos, gracias por ser mis motores de vida. A mis hermanos, que han sido mi ejemplo a seguir y me han apoyado en toda circunstancia.

A mis suegros, porque también sin dudarlo confiaron en este proyecto, y día con día nos ayudaron para que pudiéramos salir adelante con amor y paciencia. Muchas gracias.

A mis abuelas Margarita y Antonia, y mis tías Anabelle y Leticia, que durante estos cuatro años marcharon a la casa de Dios, y fueron mi inspiración.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Al Dr. Daniel Chavarría, por sembrar en mí su gran pasión por la investigación en este proceso e impulsarme para participar en todos los proyectos de investigación que tuvimos oportunidad. Gracias por motivar y creer en nosotros sus estudiantes.

A mis compañeros de la residencia: Daniela, Jorge, Melissa, Ester y Adrián una segunda familia, por el apoyo que siempre me brindaron y por su valentía.

A los profesores del Posgrado, por las enseñanzas, sabiduría y admiración que nos transmiten.

Al Dr David Lafuente, porque sin conocernos se comprometió y acogió el Posgrado para engrandecerlo y mejorarlo de una manera inmensurable. Por enseñarnos tanto y tener paciencia. Muchas gracias por creer en el futuro de este Posgrado.

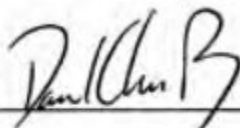
Al programa DGAPA-UNAM: PAPIIT IT203618, proyecto que me permitió la realización de estas investigaciones durante la estancia realizada en el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, DEPeI de la Facultad de Odontología, UNAM.

Al personal y al grupo humano del Laboratorio Nacional de Nanotecnología (Lanotec).

Al Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería de Materiales (CICIMA).

Y al Laboratorio de Ciencia Básicas de la UNAM.

"Este trabajo final de investigación aplicada fue aceptado por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Odontología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Profesional en Odontología con énfasis en Prostodoncia."



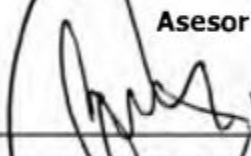
Dr. Daniel Chavarría Bolaños

**Director de Tesis**



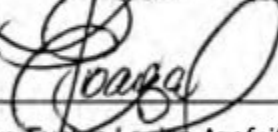
Dr. Mauricio Montero Aguilar

**Asesor**



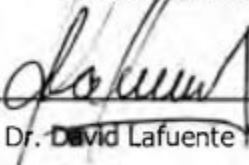
Dr. Jose Roberto Vega Baudrit

**Asesor**



Dra Evelyn Loalza Azofeifa

**Representante de la Maestría Profesional en Odontología con énfasis en Prostodoncia**



Dr. David Lafuente Marín

**Director del Programa de Posgrado en Odontología**



Diana Marcela Villalobos Vega

**Candidata**

## TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
HOJA DE APROBACIÓN .....	iv
RESUMEN.....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 REGENERACIÓN ÓSEA .....	3
2.2 INJERTOS ÓSEOS .....	4
2.3 POLÍMEROS (INJERTOS ALOPLÁSTICOS POLIMÉRICOS).....	5
2.4 IMPRESIÓN 3D.....	9
CAPÍTULO 3 MARCO METODOLÓGICO .....	12
3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	12
3.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	13
3.3 OBJETIVO GENERAL .....	13
3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3.5 HIPÓTESIS NULA.....	13
3.6 HIPÓTESIS ALTERNA .....	13
3.7 DISEÑO DEL ESTUDIO .....	14
3.8 LUGARES DONDE SE DESARROLLA LA INVESTIGACIÓN.....	14
3.9 VARIABLES.....	14
3.10 VARIABLES DEPENDIENTES.....	15
3.11 VARIABLES INDEPENDIENTES .....	16
CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA.....	17
4.1 DISEÑO DE PLA POR MEDIO DE IMPRESIÓN 3D .....	17
4.2 CARACTERIZACIÓN DEL ANDAMIO 3D .....	18
4.2.1 PERFIL TERMODINÁMICO.....	18
4.2.2 MORFOLOGÍA DEL ANDAMIO .....	20
4.2.3 ANÁLISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD.....	21
4.2.4 MICROSCOPIA CONFOCAL .....	23
CAPÍTULO 5 ESTADÍSTICA .....	24
CAPÍTULO 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
6.1 DEL DISEÑO Y LA FABRICACIÓN DEL ANDAMIO .....	25
6.2 DE LA CARACTERIZACIÓN DEL ANDAMIO.....	29
6.3 DE LA EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL ANDAMIO .....	34
CAPÍTULO 7 CONSIDERACIONES FINALES.....	36
CAPÍTULO 8 CONCLUSIONES.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38

## RESUMEN

---

**Introducción:** La tecnología de impresión 3D busca sintetizar un andamio ideal, combinando el uso de materiales poliméricos con una estructura jerárquica, que permita a las células restaurar, mantener o mejorar la función de los tejidos dañados por un trauma o enfermedad.

**Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue sintetizar, caracterizar y evaluar la biocompatibilidad de un andamio de ácido poliláctico (PLA) fabricado por medio de impresión 3D.

**Metodología:** Para la impresión del andamio se llevó a cabo un diseño por medio del uso de programas como BUILDER, CURA para obtener la estructura deseada y posteriormente imprimirlo por el método de deposición fundida capa por capa, utilizando como materia prima un filamento de 3.0 mm de ácido poliláctico (PLA). El andamio impreso 3D se caracterizó mediante las técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC), termogravimetría (TGA), análisis dinámico-mecánico (DAM), análisis de porosidad y topografía por perfilometría, y morfológico por microscopía electrónica de barrido (SEM). Asimismo, se evaluó la respuesta de biocompatibilidad utilizando osteoblastos fetales para la evaluación de la interacción célula-andamio (por microscopía electrónica y microscopía confocal), ensayos de viabilidad celular por MTT y de adhesión celular. Los resultados obtenidos fueron tabulados y analizados por un análisis descriptivo y ANOVA de dos vías.

**Resultados:** La caracterización fisicoquímica del andamio demostró la presencia del PLA sin alteraciones, y una superficie homogénea entre los andamios. Las imágenes de microscopía confocal y microscopía electrónica mostraron que las células osteoblásticas reconocen el material por la presencia de pseudópodos y una morfología que evidenció su interacción corroborado por las pruebas de adhesión celular a las 4 y 24 horas y por las pruebas de MTT a las 72 horas que mostraron un aumento en la respuesta de los osteoblastos en el andamio 3D.

**Conclusiones:** La impresión 3D aditiva de capa por capa permite obtener estructuras reproducibles en un corto periodo de tiempo. El andamio 3D de PLA impreso mostró una buena respuesta de biocompatibilidad, no ser tóxico para las células y presentar una superficie que facilita la adhesión y proliferación celular.

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Tipos de andamios poliméricos. Fuente: (5) (16) (17) .....	6
Figura 2. Requerimientos para que un andamio actúe como una matriz extracelular. ....	9
Figura 3. Técnicas de fabricación por medio de impresión 3D. Fuente: (15) (22) (27) .....	10
Figura 4. Diseño del andamio de PLA.....	17
Figura 5. Impresión del andamio 3D utilizando la impresora MakerMex donde se observan los parámetros utilizados durante la impresión. ....	18
Figura 6. Equipo para DSC. Muestra dentro de la celda. Muestras listas para DSC.....	19
Figura 7. Equipo para TGA. Proceso de colocación de la muestra en la celda.....	20
Figura 8. Equipo para SEM en proceso de recubrimiento. Medición de campo para las muestras. Muestras recubiertas con oro. ....	20
Figura 9. Termodinámica del andamio. Análisis DSC.....	28
Figura 10. Termodinámica del andamio. Análisis TGA.....	28
Figura 11. Análisis SEM de la superficie superior, lateral e interna. (45x, 200x y 1000x)..	30
Figura 12. Análisis de Microscopía Confocal. 12.1 Unión de células sobre PLA puro (Control). 12.2 Comportamiento celular sobre andamio 3D de PLA.....	32
Figura 13. Análisis de perfilometría. Izq: Superficie superior. Der: Superficie lateral .....	33
Figura 14. Gráfico de análisis de perfilometría por superficie.....	33
Figura 15. 15.1 Izq: Ensayo de adhesión celular. 15.2 Der: Ensayo de proliferación celular (MTT) .....	34

## CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

---

La ingeniería tisular se construye sobre la base de tres pilares fundamentales: la presencia de células, señales biomoleculares y un andamio tridimensional que soporte las cargas temporales durante el periodo de regeneración y que sirva como medio para que se dé el proceso de reparación de tejidos. Varios son los factores que se deben tomar en cuenta para tener predictibilidad en este procedimiento, los cuales incluyen: el tipo de andamio (método de fabricación, material utilizado, porosidad, forma, resistencia mecánica); la preparación del sitio así como la vascularidad entre otros. Aunado a estas características, se busca que un material de injerto óseo tenga cuatro propiedades importantes; siendo capaz de generar osteogénesis, osteoinducción, osteoconducción y osteointegración.

En el área de odontología, el único material que cumple con las cuatro cualidades es el hueso autólogo y por esto es el estándar de oro en materia de regeneración ósea, sin embargo; debido a sus desventajas, se ha investigado ampliamente sobre los demás tipos de injertos óseos existentes, como lo son los aloinjertos, injertos aloplásticos y xenoinjertos. No obstante, ha sido complicado fabricar el biomaterial ideal que cumpla con todas las características anteriormente mencionadas. Esto es importante porque un material biocompatible, debe permitir la adhesión, proliferación y diferenciación celular sin provocar respuesta inflamatoria alguna y lograr esto es un reto para la ingeniería tisular.

Dentro del grupo de materiales aloplásticos, está el grupo de andamios poliméricos, los cuales han demostrado diversas ventajas como su bioinercia, biocompatibilidad, bioactividad, biodegradabilidad y presentando un comportamiento mecánico adecuado. Estos andamios, pasan por una reabsorción conforme se deposita tejido óseo nuevo mientras se mantiene la forma tridimensional del sitio injertado y proveen resistencia adecuada a la carga temporal durante la regeneración.

Los andamios poliméricos se han fabricado por medio de varios procedimientos como, lixiviación de partículas, electrohilado, separación de fases, técnica de fabricación por adición y por substracción, entre otros.



El método de impresión tridimensional se divide en procedimientos aditivos y substractivos. Dentro de los métodos aditivos, se encuentra el método de deposición fundida con el que se fabrican andamios por medio de un software de acuerdo con un diseño realizado con las características que se le quiera dar al andamio, tales como tamaño del poro, interconexión porosidad, tamaño del filamento, tipo de enrejado, etc. Dadas las características específicas, estos materiales han demostrado cumplir con los objetivos de la ingeniería tisular: crear el andamio tridimensional que pueda ser injertado en el tejido para reparar una lesión o corregir un defecto por medio de adhesión, proliferación y diferenciación celular.

## CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO

---

### 2.1 REGENERACIÓN ÓSEA

La meta de la ingeniería tisular es diseñar y sintetizar un material ideal para regeneración de tejidos por medio de los llamados sistemas vivos tridimensionales, que puedan ser injertados en un tejido con el fin de inducir la reparación de una lesión o corregir un defecto por medio de adhesión y proliferación de una célula en específico. La clásica triada de la ingeniería tisular permite jugar con las características, por ello, un andamio debe permitir el crecimiento tisular, para aumentar la población celular y que se lleve la secreción de inductores o señales moleculares localmente. (1) (2) (3)

Parte del éxito de la ingeniería tisular depende de la habilidad de un andamio para permitir la difusión de nutrientes y remoción de desechos del sitio de regeneración, así como proveer un ambiente mecánico adecuado, sin provocar respuestas inflamatorias o algún proceso de rechazo del cuerpo. (4)

En el área odontológica, los primeros reportes sobre el uso de biomateriales para regeneración tisular vienen de Edgar Smith quién fue el primero en utilizar suturas, alrededor de 4000 AC y metales en reparación ósea 2000 AC. (5). Lo anterior pretendía evitar daños iatrogénicos a estructuras cercanas al área de trabajo, guiando a la creación de nuevas técnicas como elevación de seno maxilar, injertos óseos horizontales y verticales, y preservación de alvéolos como técnicas quirúrgicas. Algunas de estas estrategias, aunque presentan resultados prometedores, no han logrado garantizar un éxito total, por lo que nuevos esfuerzos se continúan realizando en diseñar nuevos biomateriales que permitan la regeneración tisular (3).

Un material de injerto óseo ideal debe contar con 3 características fundamentales como son ser osteogénico, osteoconductor y osteoinductor. El único que tiene características osteogénicas es el hueso nativo, por los osteoblastos. La osteoconductividad le permite al material estimular el crecimiento de las células óseas en la superficie. Y la capacidad osteoinductiva, es la habilidad del material para inducir la proliferación y diferenciación de células mesenquimales en pre-osteoblastos para formar la matriz extracelular. (6) (7)

## 2.2 INJERTOS ÓSEOS

Los injertos óseos se clasifican en: autólogos, aloinjertos, xenoinjertos y aloplásticos. El hueso autólogo es el estándar de oro en regeneración ósea, y consiste en la toma de tejido óseo sano, de la misma persona para ser injertado en el defecto, lo que minimiza la tasa de rechazo. Éste posee hueso cortical (buen soporte estructural y reabsorción disminuida, pero revascularización lenta) y hueso medular (revascularización temprana, por lo tanto, menos riesgo de infección, y menos tiempo de espera en caso de colocación de implantes dentales) (7) (8). Los aloinjertos son los que se derivan de sitios donadores de la misma especie (bancos de hueso), pero por su manipulación (esterilización y descelularización) para minimizar el rechazo o la transmisión de enfermedades, pierde muchas de las características importantes a nivel biológico, por lo que termina siendo solamente osteoconductiva. Los xenoinjertos derivan de especies diferentes, como hueso bovino. Han demostrado tener sobrevivencia comparable con hueso autólogo, tienen propiedades osteoconductivas y su costo es menor que el aloinjerto. Los aloinjertos y autoinjertos han demostrado éxito en restaurar la forma y función ósea, sin embargo; acarrear aún riesgos significativos. Uno de los riesgos asociados al uso de injertos autólogos es la morbilidad del sitio donador, mientras que los aloinjertos pueden implicar la transmisión de enfermedades, material comprometido por el proceso de esterilización. (3) (7) (8) (6)

Los injertos aloplásticos pueden ser fabricados con fosfato tricálcico, biocerámicas, hidroxiapatita entre otros biomateriales, a un costo menor pero su reabsorción es mayor, por lo que se recomienda mezclarlo con otro tipo de injerto (3). Estos injertos han ganado popularidad al presentarse en forma de "andamios", gracias a su biocompatibilidad, capacidad osteoconductiva y capacidad de manejar diversas cargas mecánicas. La arquitectura del andamio juega un papel importante en la determinación del grado de crecimiento celular y su futuro comportamiento biológico (9). Por definición, un andamio es un biomaterial que provee soporte como plataforma biológica que facilita la reparación adecuada y la restauración de características fisiológicas-histológicas de tejidos dañados durante el proceso de sanado (3).

### 2.3 POLÍMEROS (INJERTOS ALOPLÁSTICOS POLIMÉRICOS).

El método estándar en ingeniería de tejidos óseos es el cultivo de células en andamios, tratando de imitar una matriz extracelular ósea temporal representativa de una red de poros interconectados que sirva para guiar la proliferación, diferenciación y el eventual crecimiento celular (Mitra Asad-Eydivand, 2015, (10).

La palabra polímero se deriva del griego poli y meros, que significan mucho y partes respectivamente, también se les llama macromoléculas o molécula grande. Cada uno de los tipos de polímero se diferencia por las fuerzas intermoleculares e intramoleculares, así como por los grupos funcionales que poseen. Los polímeros son moléculas individuales cuyo tamaño no puede reducirse sin romperse los enlaces covalentes que mantienen los átomos unidos en estas moléculas de cadena (11). La composición de la cadena polimérica final influye en el tiempo de degradación, prolongando la vida media del polímero (3).

Seleccionar un polímero que participe como andamio no es tarea sencilla. Más allá de garantizar su biocompatibilidad y aceptación por parte del huésped, los andamios poliméricos deberán ser biodegradables, presentar buenas propiedades mecánicas e idealmente ser bioactivos. Además, su porosidad y topografía superficial deberá ser atractiva para las células, mientras que su interior deberá mantener su capacidad de imitar la estructura de una matriz extracelular, permitiendo la difusión de nutrientes y remoción de desechos biológicos del sitio de regeneración (12) (13). Otro tipo de clasificación que se le da a los andamios poliméricos, es por sus propiedades topográficas, tales como: rugosidad e hidrofiliidad y su microestructura: tamaño del poro, porosidad, interconectividad y arquitectura del poro y de la fibra (14).

En cuanto a tamaño de poros, diversos estudios han demostrado un alto grado de infiltración y proliferación osteoblástica en andamios con tamaño de poros más grandes (600  $\mu\text{m}$ ) que los que tenían poros más pequeños (40  $\mu\text{m}$ ). No obstante, esto depende del tipo de material utilizado, ya que hay estudios que indican que la adhesión celular disminuye con el tamaño del poro. Y es que, en la fabricación de un andamio, el diseño de la estructura es esencial para que no afecte las propiedades mecánicas ni las biológicas. Esto porque, si se aumenta el tamaño del poro, las propiedades mecánicas pueden verse perjudicadas, puesto que la estructura tridimensional se debilita al tener más espacios vacíos. Por otra parte, el tener

más poros, hace que la difusión de nutrientes y proliferación de las células sea mayor, debido a que aumentan las señales moleculares y mecánicas que promueven la adhesión y proliferación celular, y que mejoran la deposición de proteínas y formación de tejidos (Jafari, y otros, 2017) (15).

Por otro lado, algunos estudios apoyan la importancia de conocer los grupos químicos específicos de la superficie del polímero (tales como presencia de grupos hidroxilo (-OH) o grupos funcionales), los cuales independiente de la morfología, también determinarán el comportamiento biológico del andamio y su interacción celular (Saltzman & Kyriakides, 2007) (Lu Yue, 2016) (Brown B, et al. 2010).

Una amplia gama de polímeros tanto naturales como sintéticos han sido utilizados para crear los andamios, entre ellos:

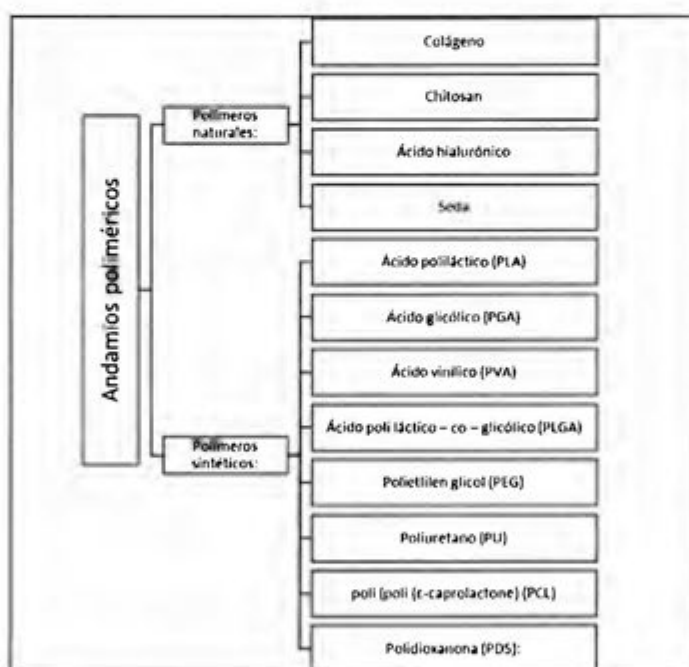


Figura 1. Tipos de andamios poliméricos. Fuente: (5) (16) (17)

El desarrollo de polímeros sintéticos se basa en un producto encontrado en la naturaleza para obtener otro de mayor utilidad, y aunque la mayoría de los primeros descubrimientos fueron empíricos, sirvieron para explicar parte de la teoría y terminología de la ciencia de

los polímeros. La producción data de hace muchos años, sin embargo, su producción se aceleró con la Segunda Guerra Mundial (11). Parte de la popularidad del uso de polímeros sintéticos, se debe a su capacidad de ser diseñados con alta capacidad de procesamiento y estabilidad mecánica (1). Además, pueden ser sintetizados bajo estricto control, alcanzando alta calidad y posibilidad de reproducción de fabricación con alta exactitud (5) (18).

Los poliésteres alifáticos constituyen la familia de polímeros sintéticos más atractiva para la investigación. Éstos son poli (ácido  $\alpha$ -hidroxi) representados por la fórmula  $-(O-CHR-CO)-n$ . Entre los poliésteres alifáticos más característicos, podemos encontrar los siguientes:

- PGA: es el más simple y fue sintetizado en 1930 por William Carothers, padre del nylon.
- PCL: es uno de los primeros polímeros sintetizados por Carothers en los años 30. Se usa como medio para sanado de heridas y como co-polímero junto con L-PLA para diseño de andamios y para RTG y ROG.
- PDS: sirve como material monofilamento para suturas y presenta poca reacción de tejido. Tiene mucha flexibilidad, retiene 60% de su fuerza después de 4 semanas, y su pérdida total de fuerza es después de 8 semanas. También se utiliza en fracturas y reconstrucciones orbitales.
- PLA: se produce de la misma manera que el PGA, por medio de apertura de anillo. Es más hidrofóbico que el PGA debido a la presencia de un grupo metil extra y más soluble en solventes orgánicos. Ésta es una molécula quiral, por lo que existe en dos formas esteroisoméricas que dan origen a 4 polímeros morfológicamente distintos: Poli (D-láctido), poli (L-láctido); su mezcla poli (D, L-láctido) y por medio de este último, el poli (meso-láctido) (5) (19) (12) (17).

El PLA es el polímero sintético biodegradable más utilizado en el campo de la salud, además es aceptado tanto por la FDA (US Food and Drugs Administration) como la EMA (Agencia de Medicina Europea). Sus propiedades mecánicas (módulo de elasticidad 1.5-2.7 GPa) y temperatura de transición vítrea alrededor de 60°C, hacen de éste, un material de fácil manipulación (20). Está comercialmente disponible para estereolitografía y para modelado por deposición fundida, y por su amplia gama de usos se han empleado en defectos en humanos y en diversos estudios tanto in vivo como in vitro.

Un polímero sintético biocompatible como el PLA posee un enorme potencial debido a que los productos de su degradación pueden ser reabsorbido por el cuerpo, creando espacio biológico para la extensión tisular. Sin embargo, el PLA solo no es suficiente para actuar directamente en la formación ósea. Posee una baja bioactividad, por lo que estos se limitan a mediar la formación ósea solo por favorecer la adhesión y proliferación celular, sin inducir directamente la osteoinducción. El PLA es más hidrofóbico que otros polímeros como el PGA, motivo por el cual se han desarrollado co-polímeros que combinan las virtudes de ambos biomateriales, como por ejemplo el PLGA (Ko, y otros, 2014) (Jeong, y otros, 2008) (14).

A pesar de las bondades del PLA y su diversidad de aplicación en la medicina, su absoluta biocompatibilidad sigue en debate, principalmente ya que los productos de degradación, pueden disminuir el pH de los tejidos circundantes, causando inflamación o reacciones de cuerpo extraño e inhibición de formación de cristales de hidroxiapatita (HA), creando una osteointegración deficiente. Las propiedades hidrofóbicas de poliésteres reabsorbibles pueden influir negativamente en la adhesión celular, por lo que se han agregado diferentes partículas bioinductivas a los andamios como nanopartículas de titanio, partículas óseas desmineralizantes, fibronectina, HA, entre otros (Roxana, et al., 2015). En cuanto a micropartículas de PLA, éstas son usadas para mantener concentraciones de fármacos por largos periodos, usados en liberación genética, terapia contra el cáncer y vacunas. En las nanopartículas, el uso es el mismo que las micropartículas, pero con la ventaja que por su tamaño puede facilitar la penetración de las membranas celulares, aumentar la liberación de fármacos, disminuir la concentración inhibitoria y la concentración bacteriana. Sin embargo, estos dos últimos usos aun necesitan de mayor evidencia para confirmar su aplicabilidad clínica (Roxana, et al., 2015) (9) (14).

Para que estos andamios puedan actuar como una matriz extracelular en la ingeniería tisular, idealmente deberán cumplir con los siguientes requerimientos.





Figura 2. Requerimientos para que un andamio actúe como una matriz extracelular.

## 2.4 IMPRESIÓN 3D

Solo un número limitado de técnicas de fabricación de andamios pueden generar características necesarias a escalas nanométricas, que logren imitar la matriz extracelular de los tejidos (1). Existen varios métodos disponibles para la síntesis de andamios; donde destacan el electrohilado, auto-ensamblaje, separación por fase, lixiviación de sal, liofilización e impresión tridimensional (16) (21) (1) (2) (22).

Formhals patentó la técnica de electrohilado en 1934, mientras que Norton patentó la técnica de hilado a presión en 1936. También se ha reportado el uso de un dispositivo con boquillas concéntricas donde la solución polimérica se inyecta dentro de una corriente de gas para generar nanofibras a partir de poliestireno (PS), polimetil metacrilato (PMMA) o ácido poli láctico (23) (Wojtak, 2012) (24) (25).

Sin embargo, mediante estos métodos no se logra un control adecuado de las características internas y de la topología de los andamios, ya que requiere un control estricto durante el



procedimiento, donde cualquier manejo inadecuado de una variable puede acarrear varios errores *que comprometen el resultado del experimento* (22) (4).

De esta manera, el método de impresión 3D pasa a ser una técnica más predecible, ya que crea una microarquitectura precisa, logrando un ambiente ideal para el crecimiento celular. Mediante este método se puede fabricar un andamio por partir de un diseño específico, lo que conlleva a controlar la arquitectura y por ello ser más reproducible en comparación con otras técnicas de elaboración de andamios (13). Esto es importante, porque las propiedades del andamio y su rigidez son esenciales para favorecer la migración celular, influenciar su morfología y estructura del citoesqueleto, y para determinar la expresión de genes y su linaje (10) (15).

Específicamente, la impresión tridimensional se divide en 3 categorías: técnica de formación, técnica sustractiva y técnica aditiva. La técnica de formación se trata de dar forma a una pieza de trabajo sin reducir o agregar material. La técnica sustractiva usualmente requiere de materiales cortantes para lograr la forma que se requiere, por ejemplo; maquinado CNC (Control Numeric Computed) de una parte precisa. Y la técnica aditiva, que se trata de agregar material capa por capa con un grosor que varía en proporción con el diámetro de la boquilla de salida de la impresora tridimensional escogida (26) (15).

Existen varias técnicas de fabricación de estructuras tridimensionales con biomateriales por medio de softwares, clasificadas en 4 principales grupos:

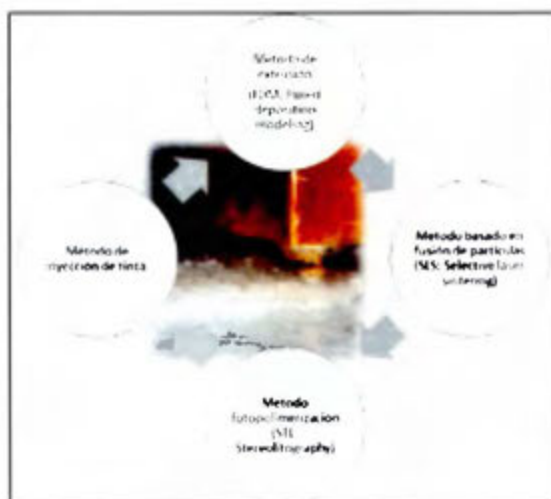


Figura 3. Técnicas de fabricación por medio de impresión 3D. Fuente: (15) (22) (27)

En el método basado en extrusión se encuentra la técnica de modelado por deposición fundida (FDM) y la técnica directa (13). Lo que diferencia el método de impresión tridimensional de los demás métodos es el hecho de poder controlar, desde su diseño (tamaño, arquitectura, paredes e interconectividad del poro) hasta su fabricación final dependiendo de la variante escogida. En este sentido, se pueden fabricar andamios que proveen adecuada resistencia a carga temporal durante la regeneración. Sin embargo, siempre existen posibles complicaciones operatorias asociadas a que aún no está clara la interacción matriz extracelular-célula, la estandarización de los sistemas biológicos y la capacidad técnica de fabricación de estos (28).

En las últimas décadas, se han utilizado diversos materiales biocompatibles y biodegradables como los polímeros, las biocerámicas y los hidrogeles en impresión tridimensional, con diversos fines como la liberación de drogas, medicina regenerativa e ingeniería tisular (22). Como anteriormente se mencionó, la biocompatibilidad, biodegradabilidad y propiedades de procesamiento fáciles del PLA, hacen del mismo uno de los polímeros primarios favoritos para el uso del método de modelo por deposición fundida; principalmente por ofrecer una materia prima renovable, de bajo costo, de fácil producción y mínima toxicidad. Sin embargo, no deja de ser un reto producir andamios rígidos tridimensionales debido a que las células en este tipo de sistemas se introducen en pasos separados, y esto aunado al hecho de que el cultivo de las mismas es usualmente un procedimiento lento puede resultar en una distribución poco uniforme de las mismas (29) (27) (13) (10).

## CAPÍTULO 3 MARCO METODOLÓGICO

---

### 3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Una de las dificultades más grandes en Odontología es tratar de preservar o reconstruir el tejido una vez que ha existido un trauma, enfermedad o la pérdida de una o varias piezas dentales. Como parte de las nuevas estrategias para abordar estos problemas, se presenta el desarrollo de andamios poliméricos que sean capaces de proporcionar una matriz biodegradable, que permita la neoformación de tejido óseo.

Existe variedad de estudios en los que se diseñan andamios de PLA con las otras técnicas, pero hay carencia de información con respecto a andamios de PLA impresos y además caracterizados. Aunque muchos esfuerzos se enfocan en la optimización y funcionalización básica de andamios, es esencial conocer la respuesta por parte de cada estructura de PLA sobre linajes celulares; y la influencia directa que las propiedades de la nano- y micro- topografías puedan ejercer sobre un grupo celular ante un mismo polímero con diferente manipulación.

La elaboración de andamios fabricados con polímeros biodegradables ha sido ampliamente utilizada para aplicaciones en la ingeniería tisular. Uno de los desafíos más grandes en este campo es el material con el que se elabora el andamio y el método utilizado para llevarlo a cabo. Estos dos procedimientos determinan las propiedades físicas y mecánicas, así como su bioactividad y funciones biológicas, necesarias para proveer señales moleculares y mecánicas para promover la adhesión celular y proliferación, y mejorar la deposición de proteínas y formación tisular.

Por ello, en el presente estudio, se pretende sintetizar un andamio de PLA por medio del método de impresión 3D aditiva de capa por capa polimérica, para caracterizarlo y evaluar su biocompatibilidad al ser sembradas las superficies de los andamios con células osteoblásticas humanas.

### **3.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Es posible elaborar y caracterizar un andamio cúbico poroso a base de PLA por medio del método de impresión 3D?

### **3.3 OBJETIVO GENERAL**

Diseñar, fabricar, caracterizar y evaluar la biocompatibilidad de un andamio a base de PLA fabricado por medio de impresión 3D.

### **3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Diseñar y fabricar un andamio de PLA por medio del método de impresión 3D.
2. Evaluar el perfil termodinámico del andamio por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y por termogravimetría (TGA).
3. Evaluar la nanomorfología del andamio por medio de SEM.
4. Evaluar la rugosidad del andamio por medio de perfilometría.
5. Evaluar la interacción biológica célula osteoblástica-andamio mediante microscopía confocal.
6. Evaluar la adhesión y viabilidad celular mediante la prueba de Cristal Violeta y MTT.

### **3.5 HIPÓTESIS NULA**

Los andamios 3D de PLA no aumentarán la respuesta biológica –adhesión, proliferación - de las células osteoblásticas, en comparación con el material en bulto (PLA).

### **3.6 HIPÓTESIS ALTERNA**

Los andamios de PLA aumentarán la respuesta biológica –adhesión, proliferación- de las células osteoblásticas, en comparación con el material en bulto (PLA).

### 3.7 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio experimental In Vitro.

### 3.8 LUGARES DONDE SE DESARROLLA LA INVESTIGACIÓN

La metodología del presente estudio se realizó en los siguientes lugares:

- a. Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- b. Laboratorio Nacional de Tecnología (LANOTEC), Centro Nacional de Alta Tecnología, San José, Costa Rica.
- c. Centro de Investigación en Ciencias e Ingeniería de Materiales (CICIMA), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- d. Laboratorio de Ciencias Básicas, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

### 3.9 VARIABLES

Perfil termodinámico	Definición conceptual	Definición operacional
Tg: Temperatura de transición vítrea	La temperatura de transición vítrea (Tg) se usa como herramienta para modificar propiedades físicas. Al conocer la Tg se puede mantener el material en estado amorfo cristalino, líquido viscoso/gomoso/ super enfriado y forma líquida menos viscosa.	DSC de flujo de calor
Tm: Punto de fusión cristalina	Inicio del punto de fusión y también la temperatura máxima, que corresponde a la fusión completa en materia orgánica y la energía que la transición de fusión necesita para producirse. Tm está asociada con la cristalinidad de los materiales.	DSC de flujo de calor
To: Temperatura de Inicio	Temperatura en la que la masa de una sustancia se empieza a perder.	Análisis termogravimétrico
Tp: Punto de Inflexión	Es el pico de la 1era derivada que indica el punto de mayor grado de cambio en la curva de pérdida de masa.	Análisis termogravimétrico



### 3.10 VARIABLES DEPENDIENTES

Adhesión	Definición conceptual	Definición operacional
ELISA	Ensayo de adhesión celular	Las células fijadas son incubadas con 0.1% de Cristal Violeta para ser leídas por medio de un lector de placas y determinar su adhesión.

Proliferación	Definición conceptual	Definición operacional
MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	Ensayo de viabilidad tipo reducción tetrazolio	Incubación de un reactivo con una población de células vivas para convertir un sustrato, en un producto fluorescente que se pueda detectar con un lector de placas.

Topografía (microestructura)	Definición conceptual	Definición operacional
SEM: Microscopía electrónica de barrido	Método de inspección de topografía de especímenes a una alta magnificación.	Un haz de electrones se enfoca en un volumen puntual de la muestra, lo que resulta en la transferencia de energía. Estos electrones bombardeadores, también conocidos como electrones primarios, desalojan los electrones de la muestra misma. Los electrones desalojados, también conocidos como electrones secundarios, son atraídos y recogidos por una rejilla o detector con polarización positiva, y luego traducidos en una señal.
Perfilometría	Determinación de la textura superficial de un material	Se utiliza una punta de diamante para detectar variaciones superficiales mínimas en la topografía de la superficie, mediante el lápiz óptico. Un puntero se desplaza sobre la superficie y detecta variaciones de rugosidad tan pequeñas como de diez angstroms de altura y esto produce una señal que se amplifica y almacena para su manipulación, análisis y visualización.

### 3.11 VARIABLES INDEPENDIENTES

Variable	Definición conceptual	Definición Operacional
Ácido Poliláctico (PLA)	Polímero alifático de ácido poliláctico semi cristalino, biodegradable y biocompatible.	La forma de obtención es directamente del ácido láctico o de la Lactida, sin embargo; la obtención por medio de ácido láctico da como resultado un PLA de bajo peso molecular y propiedades mecánicas pobres. Esto se mejoró con el desarrollo de la producción por polimerización, mediante la apertura del anillo, con un intermediario llamado Lactida.
Técnica de impresión 3D	Modelado por deposición fundida	Método de impresión tridimensional en el que se utiliza polímero preformado como material de construcción. Un filamento de PLA pasa a través de una boquilla donde se funde el material y por deposición por capas, se va formando la estructura diseñada previamente.

## CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA

---

### 4.1 DISEÑO DE PLA POR MEDIO DE IMPRESIÓN 3D

Los andamios de PLA fueron diseñados por medio del método de deposición fundida (FDM: Fused Deposition Modeling) en una impresora 3D Modular MM1 MakerMex (Ciudad de México, México) a una temperatura de 204°C en módulo flexible. Se utilizó un cartucho de filamento de PLA, cuyo grosor es de aproximadamente 3.0 mm de diámetro. Este filamento pasa a través de una boquilla donde se funde el material y por deposición por capas, se va formando la estructura que se diseña. El diseño se introdujo en el software de modelado y animación o diseño asistido por ordenador (CAD) y consistió en un modelo cúbico tridimensional de 2 cm x 1 cm x 2 cm, como se muestra en la siguiente figura.

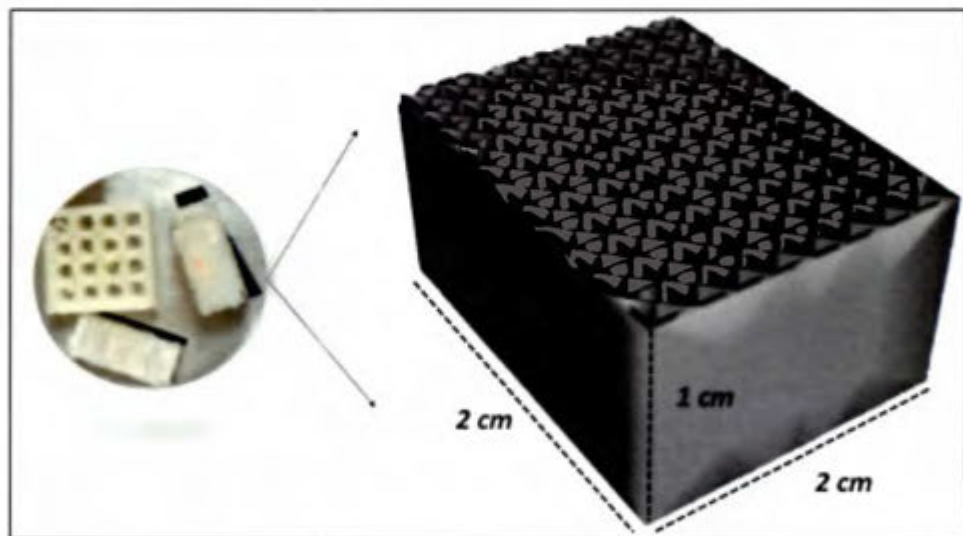


Figura 4. Diseño del andamio de PLA

Estos andamios se esterilizaron por 30 minutos con una preparación de 75% de etanol con una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100 µg/ml) y fungisona



(0.3  $\mu\text{g/ml}$ ), pasado el tiempo la solución se retira y los andamios se dejaron secar por 30 min bajo luz UV.



Figura 5. Impresión del andamio 3D utilizando la impresora MakerMex donde se observan los parámetros utilizados durante la impresión.

## 4.2 CARACTERIZACIÓN DEL ANDAMIO 3D

### 4.2.1 PERFIL TERMODINÁMICO

#### *Calorimetría diferencial de barrido (DSC)*

Se utilizó el calorímetro de flujo de calor de la empresa TA Instruments, modelo DSC Q200, con un caudal de nitrógeno de 50 mL/min como gas de purga. Se utilizó el software TA Instruments Universal Analysis 2000 para definir las propiedades del andamio, específicamente la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y el punto de fusión ( $T_m$ ). El peso

de la muestra fue de 2.5 mg, la cual se colocó en un porta muestras estandarizado de aluminio de un diámetro de 5 mm y una profundidad de 1 mm. La cápsula de DSC se selló por presión mecánica.



Figura 6. Equipo para DSC. Muestra dentro de la celda. Muestras listas para DSC.

#### *Análisis Termo Gravimétrico*

Por medio de TGA, se analizó la tasa de cambio de masa en función del aumento térmico. Éste se condujo por medio del equipo de la empresa TA Instruments TGA Q500 con un software de TA Instruments Universal Analysis 2000. Los análisis se realizaron con una rampa térmica de 25°C a 1000°C, bajo control con nitrógeno (velocidad de calentamiento 20°C/min). Las propiedades analizadas fueron el punto de inicio de pérdida de masa (On Set Point ( $T_o$ )), el punto de inflexión ( $T_p$ ), y la temperatura de pérdida total de masa ( $T_{max}$ ).



Figura 7. Equipo para TGA. Proceso de colocación de la muestra en la celda.

#### 4.2.2 MORFOLOGÍA DEL ANDAMIO

##### *Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)*

Se realizó un análisis de SEM a los andamios 3D de PLA (ASEM Microscopy JEOL JSM-6390LV, USA). Las muestras fueron recubiertas con una capa de 5 nm de oro (equipo EMS 150R, Quorum, USA). Las tres superficies de cada andamio (superior, lateral e interior) se analizaron a 5 kV a tres diferentes magnificaciones (45x, 200x, 1000x).



Figura 8. Equipo para SEM en proceso de recubrimiento. Medición de campo para las muestras. Muestras recubiertas con oro.

### *Rugosidad*

Las imágenes topográficas se tomaron con un perfilómetro de contacto (Bruker Dextak XT, USA). Se utilizó una punta de aguja de 2  $\mu\text{m}$  de radio. El eje de barrido se tomó con una fuerza aplicada de 4 mg y la resolución se ajustó a 0.033  $\mu\text{m}/\text{punto}$  (que corresponde a una velocidad de punta de aguja de 10  $\mu\text{m}/\text{s}$  que cubre un área total de 500 x 500  $\mu\text{m}$ ). La imagen se construyó uniendo 500 escaneos con una separación de 1  $\mu\text{m}$ . Los valores de rugosidad se evaluaron usando toda el área medida; determinando la rugosidad promedio (Ra), las alturas máximas promedio (Rv) y las depresiones máximas promedio (Rq).

### **4.2.3 ANÁLISIS DE BIOCOMPATIBILIDAD**

#### *Cultivo celular.*

Para la caracterización biológica se emplearon cultivos de osteoblastos fetales que se encuentran expandidas en el laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la DEPeI de la Facultad de Odontología, UNAM. Las células fueron cultivadas y expandidas en medio de cultivo alpha-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y fungisona (0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y 100mM de glutamina. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> en un ambiente con 100% de humedad.

#### *Ensayo de Adhesión Celular*

Para establecer el efecto de los andamios de PLA 3D sobre la adhesión celular, las células se cultivaron sobre andamios de 2 x 2 x 1 cm de diámetro. Se depositaron en placas de cultivo de 15 pozos a una densidad celular de 1x10<sup>5</sup> células/ml con 500 $\mu\text{l}$  de medio alpha-MEM y se cultivaron durante 4 y 24 horas a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> en un ambiente con 100% de humedad. Posterior al tiempo de sembrado; las células que no se adhirieron a las superficies se removieron por medio de tres lavados con PBS (solución amortiguadora de fosfatos). Las células adheridas a los

andamios se fijaron con 4% de paraformaldehído (PFA). La adherencia celular se evaluó de acuerdo con el método de Cristal Violeta; las células fijadas fueron incubadas con 500  $\mu$ L de la solución de cristal violeta al 0.1% por 15 minutos, se lavaron 3 veces con agua bidestilada para remover el colorante no específico y posteriormente el colorante se extrajo con 500  $\mu$ L de duodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%. De la solución obtenida se tomaron 200  $\mu$ L que se colocaron en un pozo de una placa de 96 pozos para ensayos de ELISA y se leyó en un lector de placas (Lector de placas Chromate, AWARENESS Technology) a una absorbancia de 545nm. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre los mismos platos de plásticos y una membrana de PLA al 6%. Los valores de la absorbancia obtenidos se extrapolaron de acuerdo a la curva estándar para determinar la cantidad de células o el porcentaje de células adheridas a los andamios. Los experimentos de adhesión celular se realizaron por triplicado, repitiéndose por lo menos tres veces.

#### *Ensayo de Viabilidad Celular (Proliferación)*

Para evaluar el efecto de los andamios de PLA 3D sobre la viabilidad celular se llevó a cabo el ensayo de azul de triazol (MTT) basado en la habilidad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial para oxidar una sal de tetrazolio (3-[4,5-dimetiltiazol-2-y]-2-5 bromuro difeniltetrazolio) a un producto insoluble de color azul. Las células se cultivaron a una densidad celular de  $1 \times 10^5$  células/ml en medio alpha-MEM a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> en un ambiente con 100% de humedad por triplicado por 1, 3, 5, 7, y 9 días de cultivo. Después de cada período experimental, las células se incubaron con MTT (50 mg/ml) a 37°C por 4 horas. Pasado este tiempo, el sobrenadante se removió y se le agregó una solución con 0.2 % de dimetil sulfoxido (DMSO) y se dejó actuar por 30 minutos. De la solución obtenida se tomaron 200  $\mu$ L que se colocaron en pozos de una placa de 96 pozos para ensayos de ELISA, se llevaron a un lector de placas (Lector de placas Chromate, AWARENESS Technology) para obtener la densidad óptica a una longitud de onda de 545 nm. Debido a que la generación del producto azul es (directamente) proporcional a la actividad oxidativa de la enzima deshidrogenasa, por ello, una disminución en los valores que se obtengan de la absorbancia a 545 nm indicaría una citotoxicidad celular. Los experimentos se realizaron por triplicado repitiéndose tres veces.

#### 4.2.4 MICROSCOPIA CONFOCAL

Los análisis de la interacción de las células con los andamios de PLA 3D se realizaron con el kit CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate). Este kit contiene un colorante fluorescente adecuado para el control de las interacciones o localización celular. Después de incubarlo con las células, el medio de contraste es retenido, lo que permite el seguimiento de las células adheridas que están directamente interaccionado con la superficie del andamio 3D de PLA debido a que el colorante tiene paso libre a través de la membrana. Se sembraron  $1 \times 10^4$  células/mL en los andamios 3D de PLA, y se dejaron por 24 horas. Posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron a 37°C c/medio SRF/Cell Tracker durante 1 h, pasando el tiempo indicado se retira el medio y se lava nuevamente con PBS. Se deja con medio completo Alpha-MEM durante 2hr. Por último, se lavan con agua destilada y se fijan con PFA 4%. Se observaron bajo un microscopio laser confocal con longitudes de onda de 492 y 517 nm (LASAF, Leica, Germany).

## **CAPÍTULO 5      ESTADÍSTICA**

---

Todos los datos cuantificables fueron expresados en promedios  $\pm$  desviación estándar. En el análisis estadístico se utilizó el análisis de ANOVA de dos vías para determinar la significancia estadística. Las imágenes de microscopia fueron analizadas y descritos cualitativamente.



## CAPÍTULO 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 6.1 DEL DISEÑO Y LA FABRICACIÓN DEL ANDAMIO

El tipo de diseño que se eligió en esta investigación se basó en el concepto de las 4F, el cuál menciona que un andamio debe tener forma adecuada, función temporal de soporte de tejido, mejoramiento en la formación de tejido y que todos los anteriores logren una fijación rápida del mismo (4). Como se ha mencionado anteriormente, la arquitectura del andamio debe permitir la unión inicial de células y la subsecuente migración dentro de la matriz, asimismo, deben existir los nutrientes y metabolitos necesarios, y el tamaño de poro adecuado que permita el espacio para que se desarrolle y se remodele el tejido organizado (15).

La morfología de los poros se clasifica en 3 grupos: interconectados (poros abiertos), no conectados (poros cerrados) o una combinación de ambos. Lo importante es que sean resistentes ante las fuerzas que se ejercen sobre los mismos. Uno de los mayores retos en la decisión del material y la estructura del andamio es que para lograr una adecuada resistencia y rigidez, el andamio debe tener suficiente unión interatómica e intermolecular física y además una estructura química que permita el ataque hidrolítico y la ruptura (15).

En un estudio realizado en el 2010 por Melchels et al, se diseñaron 4 tipos de estructuras de andamio según tipo de arquitectura: cúbica, diamante, circular y se hizo un diseño con estructura sal-lixiviada. En este estudio se determinó que, variando la composición de los macrómeros y la arquitectura de los poros, se pueden obtener andamios con una amplia gama de propiedades mecánicas (30).

Los diseños de los andamios también pueden ser cúbicos, cilíndricos y piramidales (31) (32). Asimismo, se pueden clasificar según una estructura básica de PLA como: estructuras ortogonales que exhiben un patrón de  $0/90^\circ$ , estructuras diagonales con un patrón de  $45/135^\circ$  o de  $60/120^\circ$  y estructuras cilíndricas porosas (33).

Para lograr dicha arquitectura, se necesita un sistema preciso con el cuál se pueda generar una estructura adecuada para el crecimiento celular. El uso de la impresión 3D, ha dado paso a la creación de andamios con ambientes ideales para las células. Anteriormente se



mencionaron los métodos utilizados, de los cuales el método por adición es el más adecuado para la generación de andamios con porosidad adecuada para defectos, ya que con este método se puede controlar adecuadamente el tamaño del poro, la forma e interconectividad. Existen diferentes enfoques de métodos de adición, como lo son 3D printing (3DP), modelado por deposición fundida (FDM), sinterización selectiva con láser (SLS), 3D plotting, entre otros; en los cuales los andamios son fabricados capa por capa (34).

Esto es importante porque tanto el diseño estructural como el procesamiento posterior, pueden influir en las propiedades mecánicas de andamios fabricados por estos medios, ya que la mayoría pasan por un proceso térmico. Esto es un desafío particular en cuanto a los andamios, ya que, se sabe que la parte externa del hueso es una estructura densa con ~10% o menos de porosidad mientras que la parte interna es altamente porosa con >50% porosidad. Imitar esta estructura es algo muy complejo con estos métodos debido a que el desafío con respecto a una contracción no uniforme durante la sinterización es casi inevitable (34).

El andamio de PLA fabricado por medio del método de 3DP mediante modelado por deposición fundida, desde que sale de la boquilla, tarda en su fabricación 8 min. Este proceso requiere el uso de materiales termoplásticos con buenas propiedades de viscosidad de fusión, debido a las altas temperaturas que se manejan (Stansbury & Idacavage, 2016) (Hutmacher, Woodfield, & Dalton, Tissue Engineering, 2015) (Zhu, Ock, Ma, Li, & Chen, 2015) (Kundu, Pati, Jeong, & Cho, 2013). Debido a lo anterior, para caracterizar los andamios y confirmar que la temperatura de trabajo del polímero no compromete la integridad estructural del polímero, se llevó a cabo un perfil termodinámico con DSC y TGA (Brown B, et al. 2010) debido a que, los polímeros tienen sensibilidad térmica que puede causar movilidad de la cadena (20). De los datos obtenidos se observa que la temperatura de impresión no afectó las propiedades del polímero, comparado con el andamio de PLA puro, esto se demostró por medio de un perfil termodinámico basado en análisis de TGA y DSC.

El análisis de TGA es una técnica en la que la masa de una sustancia es monitoreada en función de la temperatura o el tiempo al que la muestra se somete a un programa de temperatura controlado en una atmósfera controlada. Por medio de la caracterización del

andamio con esta técnica se calcula el "onset point ( $T_o$ )" que denota la temperatura en la que el peso de la masa empieza a perderse (35).

En el presente estudio la  $T_o$  para el polímero puro fue de 328.36°C y para el polímero impreso fue de 325.47°C, las cuales son reproducibles. Además, el primer pico de la primera derivada de la curva, indica el punto de mayor rango de cambio en la curva de pérdida de peso, también conocida como el punto de inflexión ( $T_p$ ), las cuales fueron para el polímero puro 340.81°C y para el andamio impreso 346.16°C. Estos resultados indican que la temperatura de fabricación del andamio (204°C), no afecta las características del mismo, ya que los cambios se empiezan a observar hasta después de los 325.47°C, por lo tanto, se puede confirmar su estabilidad en el proceso de impresión (Fig 10).

El PLA es el polímero prominente para el método de deposición fundida, por sus características. Éste tiene una temperatura de fusión de alrededor de 175°C lo hace apropiado para utilizarse en impresoras de sistemas tridimensionales donde, al igual que este estudio, se extruye el material a una temperatura entre 200°C y 300°C (Guvendiren M, 2016). En cuanto a los resultados del DSC, el PLA (puro e impreso) tuvieron resultado comparables, es decir; la temperatura vítrea ( $T_g$ ) y el punto de fusión ( $T_m$ ) no se ven alterados entre ambos, por lo que la naturaleza y condiciones del polímero se mantienen aún después de la construcción del andamio por medio de la temperatura de impresión (204°C). Esto se confirma mediante el análisis del andamio, por ausencia de señales endo/exotérmicas que denoten un comportamiento diferente. Además, se demostró que durante el proceso de fabricación no se añaden impurezas ni contaminaciones detectables en el andamio. Estas dos pruebas de caracterización se suelen realizar en estudios sobre polímero impresos por los cambios de temperatura, por lo que son muy útiles para confirmar que el polímero funciona como buen andamiaje (36) (33) (37) (38) (39).

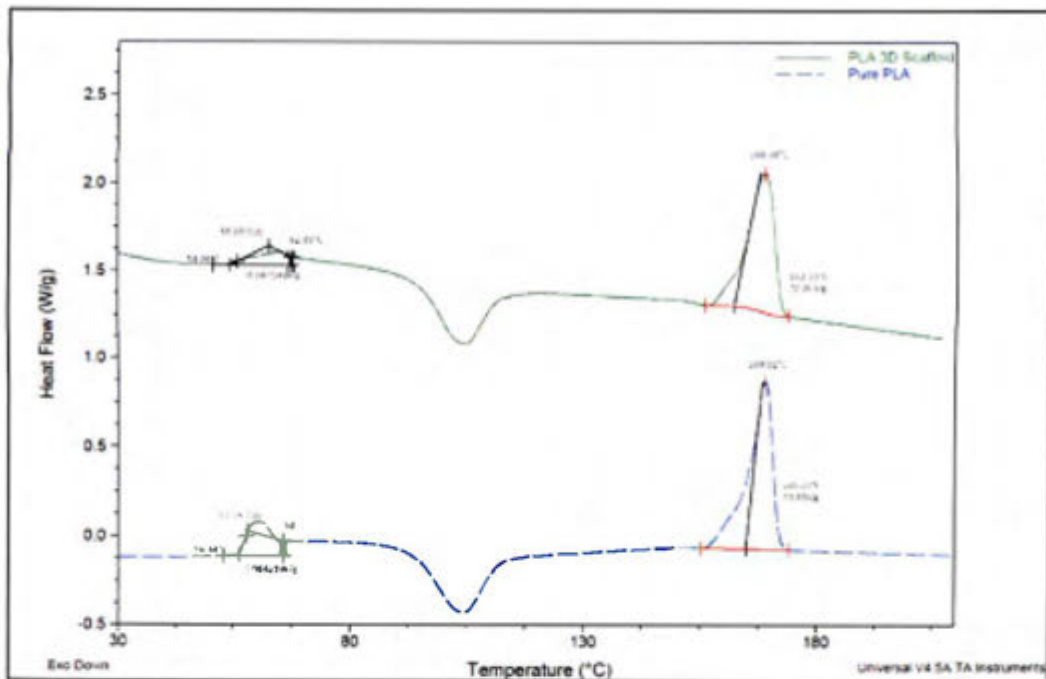


Figura 9. Termodinámica del andamio. Análisis DSC

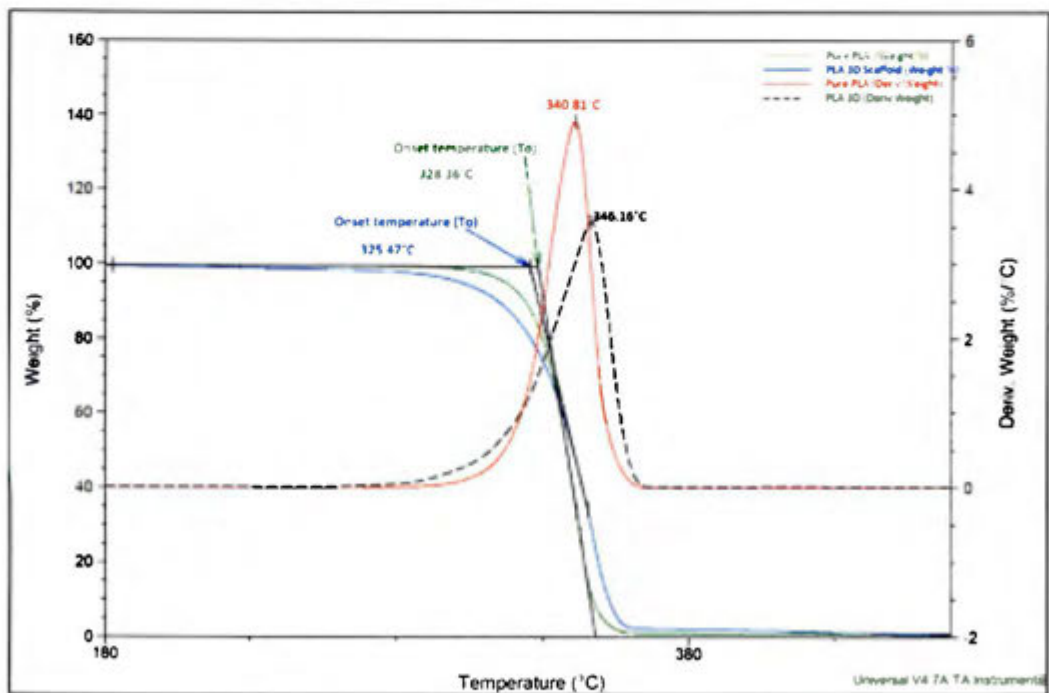


Figura 10. Termodinámica del andamio. Análisis TGA.

En la figura 9, con DSC se observa que cuando el andamio de PLA se imprime, no pierde sus propiedades, si se compara con el PLA puro. El andamio tridimensionalmente impreso se comporta similar al andamio puro, por lo que se confirma la reproducibilidad de la técnica de impresión. Asimismo, los picos a los 55.65°C y 168.98°C coinciden con la temperatura de transición vítrea y punto de fusión respectivamente.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de acuerdo con el método con las pruebas realizadas de DSC y de TGA.

**Tabla 1.** Comparación de las propiedades termodinámicas del andamio de PLA

	DSC		TGA	
	Tg (°C)	Tm (°C)	To (°C)	Tp (°C)
PLA puro	57.78	169.02	328.36	340.81
3D PLA	55.65	168.98	325.47	346.16

## 6.2 DE LA CARACTERIZACIÓN DEL ANDAMIO

Para confirmar el efecto del beneficio de una estructura de andamiaje con poros reproducibles y rugosidad media favorable para que las células puedan adherirse, infiltrarse, tener flujo de nutrientes, vascularización e integridad mecánica (Kennedy K, et al. 2016) (Moroni L, et al. 2006), la superficie del andamio de PLA 3D se analizó por medio de SEM. En las imágenes se observa la matriz polimérica como en enrejado con los poros que pueden favorecer la interacción célula-andamio y su adecuado crecimiento. Además, dicha arquitectura permite considerar futuros espacios físicos para incorporar nuevos biomateriales que favorezcan su funcionalización.

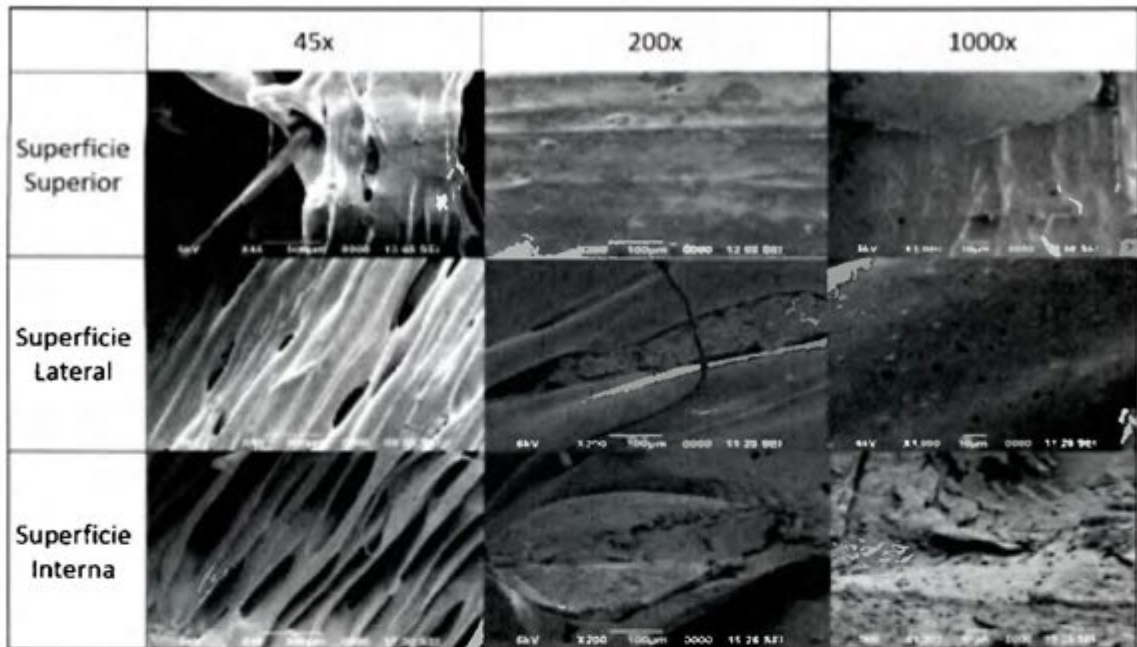


Figura 11. Análisis SEM de la superficie superior, lateral e interna. (45x, 200x y 1000x)

En la figura 11 se observan las superficies superior, lateral e interna del andamio 3D de PLA a 45x, 200x y 1000x cada una. En una descripción de superficies, a 45x:

- En la superficie interna: se observan poros interconectados en una estructura de matriz polimérica con patrón de enrejado, necesaria para que se dé la vascularización y una adecuada adhesión y proliferación de las células.
- La superficie lateral debido al diseño que se realizó tiene un patrón de enrejado menos poroso que la superficie interna, sin embargo sigue teniendo los poros necesarios y la rugosidad adecuada para que se dé el proceso de adhesión celular.
- En la superficie superior se observan prolongaciones que emergen de algunos poros, rugosidad en la superficie del andamio, así como un patrón de rayas sobre la misma.

A 200x y a 1000x todas las superficies muestran rugosidad y poros de diferentes tamaños.

Además de la química del polímero utilizado para el andamio; el tamaño del poro, el volumen y la resistencia mecánica son parámetros críticos que definen el desempeño de un andamio. Para que se dé el crecimiento óseo dentro del mismo, es esencial la interconectividad de los

poros (34). Se requiere un tamaño mínimo de poro de 100  $\mu\text{m}$  debido al tamaño celular, requerimientos de migración celular y transporte para la formación ósea. Tamaño de poros de 165-800  $\mu\text{m}$  han sido reportados en recientes estudios con varios grados de biocompatibilidad, sin embargo; andamios con tamaños de poros mayores a 300  $\mu\text{m}$  han dado mejores resultados en cuanto a formación ósea y vascularización. Como ya se ha mencionado, el comportamiento mecánico que pueda tener un andamio se ve influido por la porosidad; un aumento en la porosidad resulta en aumento en el comportamiento elástico y un alto nivel de porosidad con aumento del área de superficie por unidad de volumen, es la clave para una integración tisular óptima. Sin embargo, una alta porosidad puede resultar en propiedades mecánicas subóptimas comparadas con el tejido hospedero (34) (33). El polímero de PLA puro no presenta una superficie tan rugosa como la observada en el 3DP y mucho menos existen poros, lo que puede explicar el comportamiento biológico del andamio vs polímero puro, como que se discutirá más adelante.

Con microscopía confocal se determinó la presencia de células osteoblásticas adheridas al andamio de PLA con sus pseudópodos a lo largo de la superficie del andamio 3D, lo que demuestra que tanto el diseño como el método de impresión permiten la adhesión celular, debido a que éste se basó en poros largos y pequeños de manera que muchos comportamientos celulares como el crecimiento a lo largo de las fibras o formación de puentes entre los poros más pequeños, se pueden presentar (Kennedy K, et al. 2016) (Faroque T, et al. 2014) (Murphy C, et al, 2010).



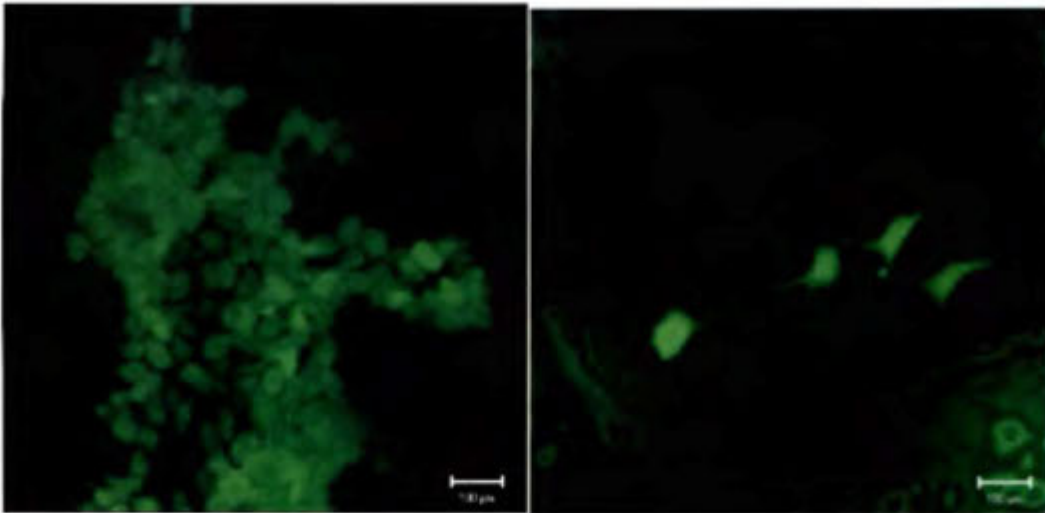


Figura 12. Análisis de Microscopía Confocal. 12.1 Unión de células sobre PLA puro (Control). 12.2 Comportamiento celular sobre andamio 3D de PLA.

Con microscopía confocal se observa la adhesión al andamio del linaje osteoblástico a las 24 horas. Además, se observó en el conteo control, muchas células osteoblásticas en el PLA puro, donde no hay verdadera interacción con el andamio (Fig 12.1), en la figura 12.2 se observa interacción entre ellas y con el andamio.

Esta interacción andamio-célula se ve influenciada por el tipo de material y su topografía; diversos estudios refieren que, tanto la adhesión como la proliferación celular dependen de la arquitectura de un andamio. Además, se ha demostrado que factores de crecimiento y citoquinas envueltas en la modulación de cicatrización de fracturas se ven influenciadas por la microtopografía del sustrato. Si el promedio de rugosidad de una superficie es mayor que el tamaño individual de un osteoblasto, esta superficie se ve lisa ya que la distancia entre picos es muy grande como para ser detectada (Hayes, J, 2011).

En algunos casos las células son orientadas por surcos presentes en el andamio a lo largo de las fibras o rebordes en la superficie, y el grado de orientación de éstas depende de la rugosidad del material (Saltzman & Kyriakides, 2007).

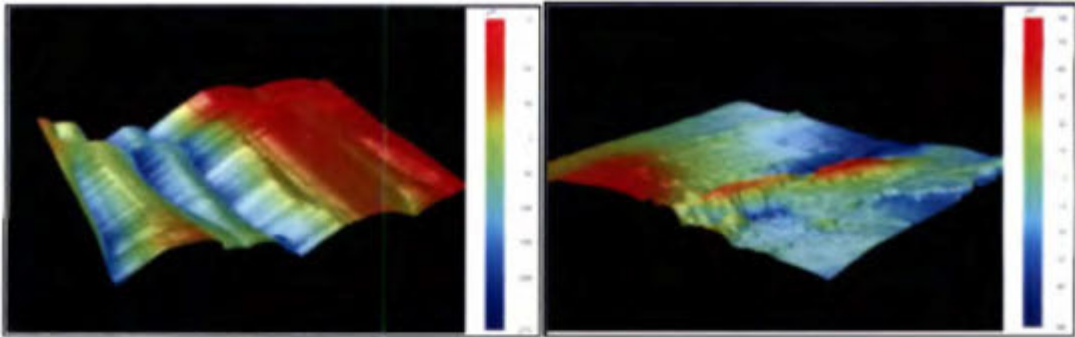


Figura 13. Análisis de perfilometría. Izq: Superficie superior. Der: Superficie lateral

Asimismo, con la figura 13 se confirma la rugosidad de las superficies superior y lateral. Según el gráfico de la Figura 14, los valores para rugosidad promedio, altura máxima y profundidad máxima, son mayores en la superficie lateral que en la superior, la rugosidad promedio de ambas superficies difiere. Esto se debe al método de impresión capa por capa que va depositando el material progresivamente en la parte lateral del mismo que culmina con la unión de la parte lateral e interna para formar la superior, por lo tanto; esa deposición le da ese grado de rugosidad a la parte lateral.

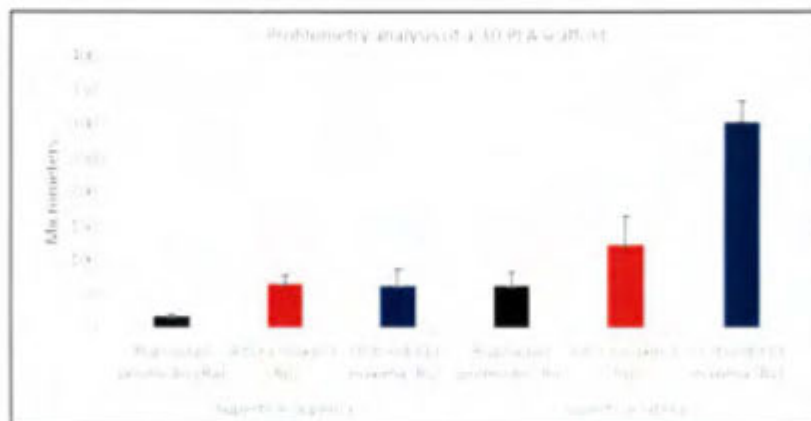


Figura 14. Gráfico de análisis de perfilometría por superficie.



### 6.3 DE LA EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL ANDAMIO

Sobre los ensayos de adhesión celular con cristal violeta y de viabilidad celular con azul de triazol (MTT), se observan en la figura 15.1 y 15.2. En la gráfica de adhesión se observa que el andamio 3D presenta una mejor interacción con las células ya que a las 24 h existe un aumento en la adhesión celular, lo que comprueba la importancia de una superficie rugosa para las células.

Por otro lado, en el ensayo de proliferación (Figura 15.2), se observa un aumento de la proliferación celular en el andamio 3D conforme pasan los días y con respecto al andamio nanofibrilar y al control, teniendo que, para el séptimo día el aumento es mayor que los demás días con respecto al andamio nanofibrilar.

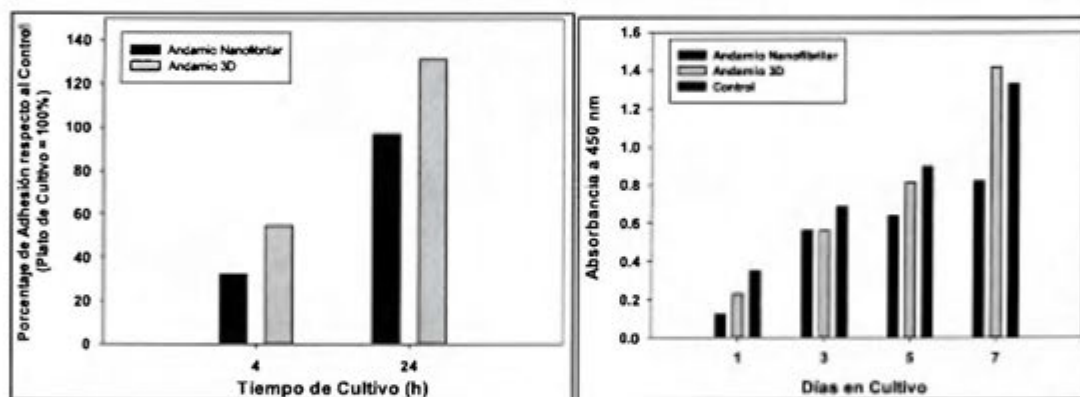


Figura 15. 15.1 Izq: Ensayo de adhesión celular. 15.2 Der: Ensayo de proliferación celular (MTT)

La proliferación celular en un tejido es un elemento crítico en la formación de la arquitectura de tejidos vivos, este es un fenómeno esencial para la ingeniería de tejidos debido a la habilidad de las células para movilizarse, ya sea por medio de un ensamblaje con el material o entre ellas (Saltzman & Kyriakides, 2007). Para los ensayos de viabilidad celular, en este estudio se analizó el cultivo celular por medio de un ensayo de MTT por 7 días, en los que se observa un aumento progresivo de viabilidad celular tanto del andamio 3D y el nanofibrilar, como del control. Sin embargo, del quinto al séptimo día, se observa un mayor

aumento por parte del andamio impresión 3D, con respecto al grupo nanofibrilar y al control, comparado con los tres días. Esto posiblemente se deba a la arquitectura rugosa controlada y poros orientados del andamio de PLA impreso, ya que como se mencionó anteriormente, la textura de un material, sobre todo la estructura interna, así como las dimensiones físicas de un andamio polimérico; como lo son los surcos, tienen un efecto significativo en el comportamiento celular, comparado con superficies lisas (40).

La manipulación física del polímero crea un efecto biológico en el comportamiento de las células, lo que es de suma importancia, ya que la mayoría de evidencia disponible se concentra en la funcionalización de un andamio, sin conocer el efecto del diseño del mismo per sé.

## CAPÍTULO 7      CONSIDERACIONES FINALES

---

1. La presente investigación presentó datos en general, bastante prometedores con respecto al uso de andamios fabricados por medio del método por deposición fundida, confirmado esto con los ensayos de biocompatibilidad celular.
2. Entre las limitaciones que se pueden mencionar del estudio están que no se funcionalizó el andamio, porque el objetivo era verificar que el andamio fabricado por medio de esta técnica de modelado por deposición fundida podía cumplir con las pruebas que se le realizaron, también se realizó con un solo linaje celular (osteoblástico) lo que podría modificarse también con células mesenquimales, entre otras. Se puede mantener un período de observación mayor a 7 días con el fin de determinar el tiempo de proliferación que puedan tener las células dentro del andamio. Se podría evaluar el impacto de la modificación de superficies con optimización micromecánica, análisis de resistencia mecánica, etc.
3. Dentro de las perspectivas que se pueden mencionar tenemos que estos andamios se pueden funcionalizar con otros materiales como con hidroxapatita (HA), ya que los estudios muestran mejores resultados cuando se unen dos materiales e incluso si son fabricados con diferentes técnicas. Se puede evaluar en otros linajes celulares partiendo de lo que se mencionó en las limitaciones. Además, en un futuro se pueden llevar a cabo estudios con modelos animales, los cuales proveen información acerca de la remoción de sustancias tóxicas del tejido (sistema abierto) y acerca de reacción de defensa del organismo entero, como una reacción inflamatoria (41).

## CAPÍTULO 8 CONCLUSIONES

---

1. En cuanto a las pruebas de perfil termodinámico (DSC y TGA), la temperatura de fabricación del andamio (204°C) no afectó las características del mismo, por lo tanto, se pudo confirmar su estabilidad en el proceso de impresión.
2. Se logró observar por medio de SEM la presencia de poros interconectados y rugosidad, en una estructura de matriz polimérica con patrón de enrejado.
3. El método de 3DP por medio de deposición de material capa por capa, le dió al andamio un grado de rugosidad superior a la parte lateral, comparado con la superficie superior e interna.
4. Mediante microscopía confocal se confirmó que tanto el diseño como el método de impresión permitieron la adhesión celular, ya que se observó la adhesión al andamio del linaje osteoblástico a las 24 horas.
5. La impresión de andamios de PLA permitió obtener estructuras similares y reproducibles. El andamio 3D de PLA mostró la capacidad de facilitar la adhesión de celular, de no ser citotóxico debido a que permitió la viabilidad traducida como proliferación celular y lo más importante la interacción de la membrana por medio de los lamelopodios como extensiones de la membrana celular.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. *Nanofibrous Scaffolds for Dental and Craniofacial Applications*. **Gupte, M J and Ma, P X.** 3, 2012, J Dent Rest, Vol. 91, pp. 227-234.
2. *Development of 3D in vitro Technology for Medical Applications*. **Ou, Keng-Liang and Hosseinkhani, Hossein.** 2014, Int J Mol Sci, pp. 17938-17962.
3. *Emerging perspectives in scaffold for tissue engineering in oral surgery. Review Article*. **Ceccarelli, Gabriele, et al.** 2017, Hindawi Publishing Coporation.
4. *Scaffold engineering: a bridge to where?* **Hollister , S.J.** 1, 2009, Biofabrication , Vol. 1, p. 012001.
5. *A Review of Material Properties of Biodegradable and Bioresorbable Polymers and Devices for GTR and GBR Applications*. **Hutmacher, Dietmar, Hurzeler, Markus B and Schliephake, Henning.** 1997, JOMI, pp. 667-678.
6. *Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review*. **Zizzari, V. L., Zara, S., Tetè, G., Vinci, R., Gherlone, E., & Cataldi, A.** 4, 2016, Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology, Vol. 122, pp. 392-402.
7. *A review of bone substitutes*. **Kao, S. T., & Scott, D. D.** 4, 2007, Vol. 19 , pp. 513-521.
8. *Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration*. **Benic, G. I., & Hämmerle, C. H.** 1, 2014, Periodontology 2000, Vol. 66, pp. 13-40.
9. *The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity*. **Woodard, Joseph R, et al.** 2007, Biomaterials, Vol. 28, pp. 45-54.
10. *Hybrid tissue engineering scaffolds by combination of three-dimensional printing and cell photoencapsulation*. **Markovic, Marica, et al.** march 2015, Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine, Vol. 6.
11. **Seymour, Raimond B and Carraher Jr, Charles E.** *Introducción a la química de los polímeros*. 3era. Barcelona : Editorial Reverté, S.A, 1995.

12. *Natural and synthetic biodegradable polymers: different scaffolds for cell expansion and tissue formation.* **Asti, Annalia and Gioglio, Luciana.** 2014, Int J Artif Organs , pp. 187-205.
13. *Designing Biomaterials for 3D Printing.* **Guvendiren, M, et al.** 10, 2016, ACS Biomaterials Science & Engineering, Vol. 2, pp. 1679–1693.
14. *Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review.* **Jafari, M, et al.** 2017, J Biomed Mater Res Part B , Vol. 105B, pp. 431-459.
15. **Hutmacher, Dietmar, Woodfield, Tim and Dalton, Paul.** Tissue Engineering. s.l. : Elsevier, 2015, pp. 311-346.
16. *Nanofibers and their applications in tissue engineering.* **Rajesh, Vasita and Katti, Dharendra.** 1, 2006, Int J Nanomedicine, Vol. 1, pp. 15-30.
17. **Kundu, Joydip, et al.** Biomaterials for biofabrication of 3D tissue scaffolds. *Kundu, J., Pati, F., Hun Jeong, Y., & Cho, D. W. (2013). Biomaterials for biofabrication oBiofabrication. Micro-and nano-fabrication, printing, patterning and assemblies.* s.l. : Elsevier, 2013, pp. 23-46.
18. *Bioresponsive materials. Nature Reviews Materials.* **Lu, Y, et al.** 2016, Nature Reviews Materials .
19. *Poly lactide acid (PLA) biomedical foams for tissue engineering.* **Mohammadi, M Shah, Bureau, M N and Nazhat, S N.** 2014, Woodhead Publishing Limits, pp. 313-334.
20. **Carrow, James , et al.** Polymers for Bioprinting. *Essentials of 3D Biofabrication and Translation.* s.l. : Elsevier, 2015, pp. 229-248.
21. *Electrospun Poly (L-Lactide -co-E-Caprolactone)/Polyethylene Oxide/Hydroxyapatite Nanaofibrous Membrane for Bone Regeneration.* **Wang, Gang, et al.** 2010, Journal of Nanomaterials.
22. **Zhu, Wei, et al.** 3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Enginnering and Regenerative Medicine. s.l. : Elsevier, 2015, pp. 25-55.



23. *The support of bone marrow stromal cell differentiation by airbrushed nanofiber scaffolds.* **Tutak, Wojtek, et al.** s.l. : Elsevier, 2013, *Biomaterials* , Vol. 34, pp. 2389-2398.
24. *Electrofluidodynamics: exploring a new toolbox to design biomaterials for tissue regeneration and degeneration.* **Guarino , Vincenzo and Ambrosio, Luigi.** 2016, *Nanomedicine*, pp. 1515-1518.
25. *Micro-and nanocarriers by electrofluidodynamic technologies for cell and molecular therapies.* **Altobelli, Rosaria, Vincenzo, Guarino and Ambrosio, Luigi.** 12, 2016, *Process Biochemistry*, Vol. 51, pp. 2143-2154.
26. *3D printing with polymers: Challenges among expanding options and opportunities.* **Stansbury, Jeffrey and Idacavage, Mike.** 2016, *Dental Materials* , Vol. 32, pp. 54-64.
27. —**Stansbury, J. W and Idacavage, M. J.** 1, 2016, *Dental Materials*, Vol. 32, pp. 54-64.
28. **Luo, Ying, y otros.** 3D Scaffold. *Principles of tissue engineering.* s.l. : Elsevier Inc, 2014, págs. 475-493.
29. *In vitro Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells and In Vivo Formation in Composite Nanofiber Meshes.* **Ko, Eun Kyong, et al.** 12, 2014, *Tissue Engineering*, Vol. 14, pp. 2105-2119.
30. *Mathematically defined tissue engineering scaffold architectures prepared by stereolithography.* **Melchels , E.P.W, et al.** 27, 2010, *Biomaterials*, Vol. 31, pp. 6909-6916.
31. *3D printing facilitated scaffold-free tissue unit fabrication.* **Tan, Y, et al.** 2, 2014, *Biofabrication*, Vol. 6, p. 024111.
32. *Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds.* **Senatov, F.S, et al.** 2016, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedicalmaterials* , Vol. 57, pp. 139-148.
33. *Influence of scaffold design on 3D printed cell constructs.* **Souness, A, et al.** 2017, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2015:00B:000–000.

34. *Bone tissue engineering using 3D printing.* **Bose, S, Vahabzadeh, S and Bandyopadhyay, A.** 12, 2013, *Materials Today*, Vol. 16, pp. 496-504.
35. **Widman, Georg.** *Interpreting TGA curves. UserCom1.* Suiza : Mettler Toledo, 2001.
36. *Collagenous matrix supported by a 3D-printed scaffold for osteogenic differentiation of dental pulp cells.* **Fahimipoura, F, et al.** 2017, *Dental Materials*.
37. *Influence of the addition of  $\beta$ -TCP on the morphology, thermal properties and cell viability of poly (lactic acid) fibers obtained by electrospinning.* **Siqueira, L, et al.** 2015, *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 52, pp. 135-143.
38. *Mesenchymal stem cells growth and proliferation enhancement using PLA vs PCL based nanofibrous scaffolds.* **Marei, N.H, et al.** 2016, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 93, pp. 9-19.
39. *Mechanical, thermal and morphological properties of poly (lactic acid)/epoxidized palm olein blend.* **Silverajah, V.S, et al.** 10, 2012, *Molecules*, Vol. 17, pp. 11729-11747.
40. **Saltzman , W.M and Kyriakides, T.R.** *Cell interactions with polymers. Principles of tissue engineering.* 3ra Edición. s.l. : Elsevier, Inc, 2000, pp. 280-296.
41. *Bone engineering in dog mandible: Coculturing mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells in a composite scaffold containing vascular endothelial growth factor.* **Khojasteh, A, et al.** 2016, *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 105B, pp. 1767-1777.
42. *Poly lactide nanofibers with hydroxiapatite as growth substrate for osteoblast-like cells.* **Novotna, Katarina, et al.** 2013, *J Biomed Mater Res Part .*
43. *3D Scaffolds.* **Luo, Ying, et al.** 2014, Elsevier, pp. 475-495.
44. *3D Printable Antimicrobial Composite Resins.* **Yue, Jun, et al.** 2015, *Adv Funct Mater.*
45. **Xiao, Lin, et al.** *Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications.* [ed.] Prof. Dhanjoo N. Ghista. 1era. China : In Tech, 2012. pp. 246-280.

46. *Rapid prototyping for tissue-engineered bone scaffold by 3D printing and biocompatibility study.* **He, Hui-Yu, et al.** 7, China : Int, 2015, Int J Clin Exp Med, Vol. 8, pp. 11777-11785.
47. *Air jet spinning of hydroxyapatite/poly (lactic acid) hybrid nanocomposite membrane mats for bone tissue engineering.* **Abdal-hay, Abdalla, Sheihh, Faheem A and Lim, Jae Kyo.** 2013, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, pp. 635-643.
48. *3D Printing Facilitated Scaffold-free Tissue Unit Fabrication.* **Tan, Yu, et al.** 2014, Biofabrication.
49. *Nanofibrous Poly (lactic acid/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Guided Tissue Regeneration.* **Jeong, In Sung, et al.** 2008, Mchromol Sci, Vol. 8, pp. 328-338.
50. **Nisbet, D.R, et al.** 7, s.l. : SAGE, 2009, J Biomaterials Appl, Vol. 24.
51. *Current Uses of Poly (Lactic-co-glycolic acid) in The Dental Field: A Comprehensive Review.* **Roxana, Maria Justina, et al.** s.l. : Hindawi Publishing Corporation, 2015, Journal of Chemistry, p. 12.
52. *Scaffold design and manufacturing: from concept to clinic.* **Hollister, S.J.** 21, Adv Mater, Vols. 32-33, pp. 3330-3342.
53. *Comparison of micro-leakage around temporary restorative materials placed in complex endodontic access cavities: an in vitro study.* **Adnan, Samira and Raza Khan , Farhan.** 3, 2016, Journal of the Collage of Physidans and Surgeons Pakistan, Vol. 26, pp. 182-186.