



## “Creación y evaluación biológica de andamios de policaprolactona (PCL) para regeneración ósea.”

Esquiliano Meliton Ian

Universidad Modelo. Ingeniería Biomédica. Carretera Mérida-Cholul, 200 m después del Periférico, Mérida, Yucatán 97305.

Tel: (999) 930 19 00. miesquiliano@gmail.com

*Palabras clave: Ingeniería Tisular, Andamios óseos, Impresión 3D, Policaprolactona (PCL)*

**Resumen:** Este proyecto implica el diseño y creación de un andamio óseo de 5 capas. El andamio se diseña utilizando un software CAD y luego se imprime en 3D con la técnica de modelo de deposición fundida. El polímero utilizado para la creación del andamio es la policaprolactona (PCL). Después de la fase de diseño y creación del proyecto, el andamio se someterá a pruebas de viabilidad celular para confirmar si el diseño es adecuado para el crecimiento y la diferenciación celular. La intención de un andamio es estimular el crecimiento y la diferenciación celular para mejorar el proceso de curación del tejido humano. Por lo tanto, la viabilidad celular es de suma importancia cuando se trata de probar la viabilidad del diseño del andamio. La prueba de viabilidad celular implicará la adhesión celular a la estructura, la proliferación y la diferenciación celulares. Este proyecto es posible gracias al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

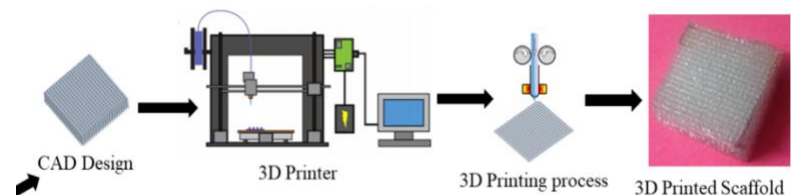
**Introducción.** Los huesos del cuerpo humano tienen la capacidad de regenerarse. La mayoría de las fracturas pueden sanar rápidamente con una simple fijación. Sin embargo, hay ciertas lesiones que no pueden sanar tan fácilmente como se indicó anteriormente. Por ejemplo, un defecto óseo segmentario es bastante difícil de curar. Aquí es donde se aplica el área de la ingeniería de tejidos con el uso de andamios para promover la curación. Los andamios óseos son estructuras porosas que

proporcionan un sustrato mecánico y estructural para apoyar el crecimiento celular (An et al., 2015). La estructura de dicho andamio permite que el oxígeno y los nutrientes migren desde la superficie del andamio a la parte interior. Un andamio óseo ideal debe poseer las siguientes características (Miri et al., 2023):

- Porosidad: El andamio debe poseer una alta porosidad para que pueda haber un flujo de nutrientes, oxígeno y productos de desecho. Este último es necesario para el crecimiento y el metabolismo celular.
- Biocompatibilidad: El material del andamio no debe ser tóxico y no provocar reacciones adversas en el organismo.
- Bioactividad: el andamio debe poseer la capacidad de estimular la regeneración ósea estimulando el crecimiento y la diferenciación de las células.
- Propiedades mecánicas: el andamio debe poder soportar el peso de los tejidos circundantes y tolerar la carga mecánica durante la regeneración ósea.
- Estabilidad estructural: el andamio debe poseer la capacidad de mantener su integridad estructural durante las etapas iniciales de la formación ósea. Los materiales utilizados para los andamios óseos pueden variar dependiendo de cuál sea exactamente la función del andamio. Está creado para verse y actuar como tejido óseo. Algunos de los materiales comunes utilizados en los diseños de

estructuras óseas incluyen cerámica, polímeros y metales. Un polímero biodegradable comúnmente utilizado es la policaprolactona (PCL). PCL es una sustancia termoplástica fácil de manipular debido a su bajo punto de fusión y sus sencillas propiedades de impresión (Roseti et al., 2017). PCL se utiliza para crear andamios utilizando filamentos de impresión 3D. PCL es un polímero que ha sido aprobado por la Federal Agency of Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos para aplicaciones biomédicas (Yahay et al., 2023). Hay ciertos factores que limitan su uso en estas aplicaciones. Estos factores incluyen propiedades mecánicas deficientes, baja bioactividad y tasa de degradación lenta. La impresión 3D es una técnica de fabricación que permite la construcción capa a capa de objetos tridimensionales. Lo que lo hace versátil es la amplia gama de materiales que se pueden utilizar para imprimir. Estos materiales incluyen, entre otros, plásticos, metales y cerámicas. La impresión 3D se utiliza en la industria médica para producir implantes, prótesis y andamios especializados (Zhang et al., 2023). La producción de estructuras óseas de polímero mediante el proceso de modelado por deposición fundida (FDM) es uno de esos usos (Kennedy et al., 2023). El filamento de polímero utilizado en la tecnología FDM se calienta antes de extruirlo a través de una boquilla. El elemento 3D requerido se produce cuando la boquilla se mueve en las direcciones de los ejes X, Y, y Z mientras deposita el filamento capa por capa. Al imprimir un andamio óseo de polímero, el procedimiento comienza utilizando un software CAD para crear un modelo 3D del andamio necesario. Una vez completado, el

modelo se carga en una impresora 3D utilizando una extrusora FDM (Wang et al., 2020). Después de leer el modelo 3D, la impresora construye el andamio colocando capas sobre el filamento de polímero. Este método de impresión se utiliza una y otra vez hasta que se imprime todo el andamio. El andamio debe enfriarse y endurecerse una vez finalizada la impresión antes de poder usarse. El andamio final tiene huecos conectados de un tamaño particular y es poroso, imitando la estructura del hueso de forma natural. Esto permite el paso de nutrientes y oxígeno, favoreciendo la proliferación celular y la regeneración de tejidos. La obtención de un modelo 3D, la extrusión de filamentos poliméricos biodegradables y biocompatibles, la deposición capa por capa y la solidificación son los pasos necesarios para crear un andamio óseo polimérico utilizando la tecnología FDM. FDM es una opción atractiva para producir andamios para aplicaciones de ingeniería de tejidos porque el andamio resultante sirve como plantilla ideal para la regeneración y reparación del tejido óseo (Roohani-Esfahani et al., 2016).



La Figura 1 muestra el proceso del andamio impreso en 3D FDM (Arora & Bhati, 2020).

**Objetivo General:** Diseñar y crear un andamio de forma cúbica impreso en 3D para la regeneración ósea, con 5 capas diferentes, utilizando el polímero biodegradable Policaprolactona (PCL).



### **Objetivo Especifico:**

- El diseño del andamio óseo de 5 capas utilizando el software OpenSCAD. El diseño utilizará un diámetro de filamento de 0.4mm y las dimensiones máximas serán 15x15x17.5mm.
- La impresión 3D del diseño utilizando la impresora 3D Makerbot que se encuentra ubicada en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). El diseño se imprimirá a 3 temperaturas diferentes: 180 grados, 190 grados, 200 grados.
- Las estructuras impresas se compararán y luego se elegirá la mejor en función de la estructura general que se observará a través de un microscopio óptico.

### **Planteamiento del problema y justificación.**

El proceso de diseñar, imprimir y probar un andamio puede ser largo. Lo que pretende lograr esta investigación es analizar si es factible mitigar este tiempo necesario para dicho proceso. Uno de los objetivos principales de un andamio es proporcionar un área donde las células puedan vivir y crecer para estimular el proceso de curación. Por tanto, la viabilidad del crecimiento de las células es una prueba importante en el procedimiento de prueba del andamio.

El objetivo principal de este proyecto es comprobar si el CICY puede ahorrar tiempo y recursos para futuros proyectos. Esta investigación servirá de precedente para dichos proyectos futuros. Los andamios normalmente se prueban con un solo diseño. El problema principal es la prueba de viabilidad celular.

Las células in vitro son costosas y el precio normalmente ronda los 15.000 pesos. Además, las pruebas de viabilidad requieren aproximadamente un mes para permitir que las células crezcan y luego puedan analizarse. Este proceso normalmente se repite para diseños de andamios diferentes e individuales y luego se compara para ver qué diseño produce la mejor viabilidad.

### **Materiales y métodos.**

#### *Diseño del andamio:*

La investigación comenzará con el diseño del andamio multicapa en el software OpenSCAD. El andamio tendrá unas dimensiones máximas de 15x15x12,5mm. El andamio será de 5 capas. El filamento que conforma las capas tendrá un diámetro de 0,3mm y el espacio entre filamentos será también de 0,3mm.

#### *Prueba de la mejor temperatura para imprimir*

Una vez que la estructura se haya diseñado correctamente, se imprimirá utilizando una impresora 3D, la Makerbot. Esta impresora está ubicada y proporcionada por el Centro de Investigación Científica de Yucatán. La estructura se imprimirá con policaprolactona (PCL). PCL imprime entre 70 y 110 grados. Este es un rango relativamente amplio, por lo que se debe realizar una prueba para encontrar la temperatura adecuada para imprimir la estructura. Esto se hace para reducir los errores o errores en el diseño por parte del impresor. El andamio se imprimirá a 80, 90 y 110 grados. Luego, cada andamio se cortará por la mitad y luego se colocará bajo un microscopio óptico, el Olympus. Luego se analizará minuciosamente la estructura de cada uno para ver si



hay alguna falla en la estructura. Luego se compararán los datos y se seleccionará la temperatura adecuada.

#### *Impresión final*

Una vez que se hayan seguido todos los pasos anteriores, se imprimirá el andamio con el diseño finalizado y la temperatura adecuada. Luego, el andamio se enviará al laboratorio de biología para realizar pruebas de viabilidad celular.

#### *Análisis de adhesión celular*

Para evaluar el efecto de los andamios sobre la adhesión de las DPSC, las muestras fueron cortadas en fragmentos de 5 mm de largo, por 5 mm de ancho y fueron desinfectadas con medio transporte durante 48 h a 4°C, seguido de tres lavados con PBS. Se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^5$  de DPSC en cada una de las muestras. Usando un microscopio electrónico de barrido; se examinó la formación de lamelipodios y filopodios de las células adheridas en cada uno de los andamios en diferentes tiempos (5 y 35 días). Pasado el tiempo de interés, las muestras se lavaron 3 veces con PBS, y fueron fijadas con la solución de Karnovsky, constituida por glutaraldehído al 2.5 % y paraformaldehído al 2% en PBS, durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó tres lavados con PBS, las muestras se deshidrataron con una serie de concentraciones de etanol (50, 60, 70, 80, 90 y 100 %), durante 10 min cada una. En etanol al 90 % y al 100 % las muestras se sumergieron dos veces por 10 min en cada uno. Finalmente, las muestras se recubrieron con oro y se observaron en el microscopio electrónico de barrido (JSM-5410LV).

#### *Ensayo de proliferación Celular*

La proliferación de DPSC en los andamios (5 mm x 5 mm) se determinó usando el kit de MTT (Sigma-Aldrich). El ensayo con MTT se utiliza para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad, la proliferación y la citotoxicidad celular. Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción de una sal soluble de tetrazolio amarilla (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristales de formazán insolubles de color morado por las células metabólicamente activas/vivas. En los andamios se sembraron  $5 \times 10^3$  células/pozo y se incubaron por 0, 3, 7 y 10 días bajo condiciones estándar de cultivo.

En cada uno de los días de estudio, las muestras fueron tratadas con Tryple Express™ (GIBCO) para aislar las células de los andamios. Posteriormente la solución de Tryple Express™ (GIBCO) con las células y el andamio, fue centrifugada a 1,200 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante y el andamio. En cada muestra, se añadió 64  $\mu$ L de DMEM sin rojo fenol (Sigma-Aldrich) y 6  $\mu$ L de solución de MTT (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich), seguido de incubación durante 4h a 37 °C con el 5 % de CO<sub>2</sub> y con el 85% de humedad, protegido de la luz. Después de pasar este tiempo de incubación, los cristales de formazan fueron disueltos con 100  $\mu$ L de isopropanol durante toda la noche bajo condiciones estándar de cultivo, protegido de la luz. Posteriormente, la solución con los cristales de formazan disueltos en el isopropanol se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se midió la fluorescencia (excitación a 570 nm, emisión a 590 nm) utilizando un espectrofotómetro (Epoch, BioTek).



Las células cultivadas en los pozos sin en el andamio y bajo las mismas condiciones de cultivo, se usaron como control positivo. Las mediciones de absorbancia se realizaron por quintuplicado.

#### *Análisis de diferenciación celular*

Las células del tercer pase celular se sembraron a una densidad  $1 \times 10^5$  células/pozo bajo condiciones estándar de cultivo y con medio de cultivo estándar durante 35 días.

#### *Mineralización de la MEC*

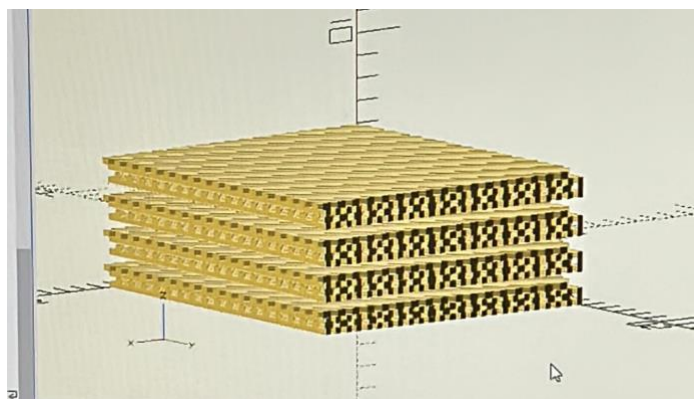
La mineralización de la MEC se evaluó a los 35 días de cultivo. Las células cultivadas en el pozo sin el andamio y bajo las mismas condiciones de cultivo, se usaron como control negativo, y las células cultivadas con el kit de diferenciación osteogénico (MesenCult<sup>TM</sup>, StemCell) sin andamio se usaron como control positivo.

La solución de trabajo de rojo alizarina se preparó a una concentración de 1 g de colorante de rojo alizarina (Sigma-Aldrich) en 50 mL de agua destilada, ajustando el pH entre 4.1 y 4.3 agregando  $\text{NH}_4\text{OH}$ , se dejó en agitación durante 60 min a temperatura ambiente, cubriéndolo de la luz. Las muestras se lavaron tres veces con 1 mL de agua destilada y fueron fijadas con formalina neutra al 10% durante 20 min a temperatura ambiente. Se agregó 200  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo de rojo alizarina en cada una de las muestras por 5 min transcurrido el tiempo, las muestras se lavaron con agua común y se procedió a observar en el microscopio óptico (OLYMPUS CK40).

### **Resultados previos**

Después de una cuidadosa revisión de lo que se necesitaba, se diseñó un andamio de 5 capas

utilizando el software OpenSCAD. Las capas están compuestas de filamentos de PCL con los siguientes ángulos. La primera capa es de filamentos a 90 grados, luego 45, luego 90, luego -45, luego 90. Lo que esto hace es crear una estructura similar a una malla con pequeños espacios en el medio para que las células y los nutrientes puedan fluir libremente. La Figura 2 es una imagen del diseño finalizado en el software CAD.



La Figura 2 muestra el diseño del andamio que se utilizará.

En la siguiente fase del experimento. El andamio se imprimió a 3 temperaturas diferentes: 80, 90 y 100 grados. Luego, las estructuras se cortaron por la mitad y luego se inspeccionaron en busca de errores o fallas en la estructura causadas por el proceso de impresión. Se determinó que la mejor temperatura para imprimir el andamio era 90 grados.

El último paso fue imprimir el andamio a la temperatura adecuada. La figura 3 muestra el producto final de dicho diseño.





La Figura 3 muestra el producto final del andamio utilizado en este proyecto.

**Conclusiones y perspectivas.** En conclusión, este proyecto es uno que actualmente se encuentra en proceso de finalización. Hasta este punto cuando se está escribiendo el artículo. Lo que se ha logrado es la primera fase del proyecto que es el diseño e impresión final del andamio. Lo que queda son las pruebas de viabilidad celular. Estas pruebas tomarán un tiempo aproximado de 35 días. Una vez recopilados los resultados, se analizarán y luego la tesis entrará en su fase final. En conclusión, el diseño y la creación del andamio de 5 capas está finalizado y listo para ser sometido a pruebas adicionales. Concluyo que la mejor temperatura para imprimir PCL para este diseño de andamio es 90 grados, ya que permite que el filamento permanezca circular y no plano cuando se deposita en la placa. Esto asegura que el espacio entre los filamentos sea consistente y esté presente, ya que estos espacios son esenciales para el crecimiento y la diferenciación celular.

### Referencias.

An, J., Teoh, J. E. M., Suntornnond, R., & Chua, C. K. (2015). Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues. *Engineering*, 1(2), 261–268. <https://doi.org/10.15302/J-ENG-2015061>

Arora, J. K., & Bhati, P. (2020). Fabrication and characterization of 3D printed PLA scaffolds. *AIP Conference Proceedings*, 2205. <https://doi.org/10.1063/1.5142980>

Granados, M. V, Montesinos-Montesinos, J. J., & Álvarez-Pérez, M. A. (n.d.). *Adhesión y proliferación de las células troncales mesenquimales de médula ósea en andamios fibrilares de poli (ácido L-láctico) (PLA)* *Adhesion and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells onto poly-Llactic acid (PLA) fiber scaffolds*. <https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.24>

Kennedy, S. M., Amudhan, K., Jeen Robert, R. B., Vasanthanathan, A., & Vignesh Moorthi Pandian, A. (2023). Experimental and finite element analysis on the effect of pores on bio-printed polycaprolactone bone scaffolds. *Bioprinting*, 34, e00301. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2023.e00301>

Miri, Z., Haugen, H. J., Loca, D., Rossi, F., Perale, G., Moghanian, A., & Ma, Q. (2023). Review on the strategies to improve the mechanical strength of highly porous bone bioceramic scaffolds. *Journal of the European Ceramic Society*. <https://doi.org/10.1016/J.JEURCERAMSOC.2023.09.003>

Roohani-Esfahani, S. I., Newman, P., & Zreiqat, H. (2016). Design and Fabrication of 3D printed Scaffolds with a Mechanical Strength Comparable to Cortical Bone to Repair Large Bone Defects. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep19468>

Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., & Grigolo, B. (2017). Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 78, pp. 1246–1262). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>

Wang, C., Huang, W., Zhou, Y., He, L., He, Z., Chen, Z., He, X., Tian, S., Liao, J., Lu, B., Wei, Y., & Wang, M. (2020). 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. In *Bioactive Materials* (Vol. 5, Issue 1, pp. 82–91). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.004>



Yahay, Z., Moein Farsani, N., Mirhadi, M., & Tavangarian, F. (2023). Fabrication of highly ordered willemite/PCL bone scaffolds by 3D printing: Nanostructure effects on compressive strength and in vitro behavior. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 144, 105996. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2023.105996>

Zhang, Q., Zhou, J., Zhi, P., Liu, L., Liu, C., Fang, A., & Zhang, Q. (2023). 3D printing method for bone tissue engineering scaffold. *Medicine in Novel Technology and Devices*, 17. <https://doi.org/10.1016/j.medntd.2022.100205>